

## UP-CONVERTING REPORTERS FOR BIOLOGICAL AND OTHER ASSAYS USING LASER EXCITATION TECHNIQUES

**Patent number:** JP8501632T

**Publication date:** 1996-02-20

**Inventor:**

**Applicant:**

**Classification:**

- international: *G01N33/53; A61K33/42; A61K41/00; A61K49/00; A61N5/06; A61P35/00; A61P37/06; A61P43/00; C12Q1/68; G01N21/64; G01N33/483; G01N33/532; G01N33/533; G01N33/536; G01N33/569; G01N33/58; G01N33/68; G01N33/74; C40B60/14; G01N33/53; A61K33/42; A61K41/00; A61K49/00; A61N5/06; A61P35/00; A61P37/00; A61P43/00; C12Q1/68; G01N21/64; G01N33/483; G01N33/532; G01N33/533; G01N33/536; G01N33/569; G01N33/58; G01N33/68; G01N33/74; C40B60/14; (IPC1-7): G01N33/53; G01N33/53; G01N33/536; G01N33/569; G01N33/68; G01N33/74*

- european: C12Q1/68B2; C12Q1/68B2B; G01N21/64H; G01N33/533; G01N33/58D; G01N33/58J; Y01N8/00

**Application number:** JP19930508282T 19930914

**Priority number(s):** WO1993US08712 19930914; US19920946068 19920914

**Also published as:**



WO9407142 (A1)  
EP0660936 (A1)  
JP2005104980 (A)  
JP2003177096 (A)  
EP0660936 (A0)

[more >>](#)

[Report a data error here](#)

Abstract not available for JP8501632T

Abstract of correspondent: **WO9407142**

The invention provides methods, compositions, and apparatus for performing sensitive detection of analytes, such as biological macromolecules and other analytes, by labeling a probe molecule with an up-converting label. The up-converting label absorbs radiation from an illumination source and emits radiation at one or more higher frequencies, providing enhanced signal-to-noise ratio and the essential elimination of background sample autofluorescence. The methods, compositions, and apparatus are suitable for the sensitive detection of multiple analytes and for various clinical and environmental sampling techniques.

~~~~~  
Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平8-501632

(43) 公表日 平成8年(1996)2月20日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>

G 0 1 N 33/53

識別記号

庁内整理番号

F I

D 8310-2 J

J 8310-2 J

33/536

E 8310-2 J

33/569

G 8310-2 J

33/68

8310-2 J

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全110頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-508282  
(86) (22) 出願日 平成5年(1993)9月14日  
(85) 翻訳文提出日 平成7年(1995)3月13日  
(86) 国際出願番号 PCT/US93/08712  
(87) 国際公開番号 WO94/07142  
(87) 国際公開日 平成6年(1994)3月31日  
(31) 優先権主張番号 07/946, 068  
(32) 優先日 1992年9月14日  
(33) 優先権主張国 米国 (US)  
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), CA, JP, KR

(71) 出願人 エス・アール・アイ・インターナショナル  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 94025  
メンロ・パーク、レイヴンズウッド・ア  
ヴェニウ 333  
(72) 発明者 ザーリング, デヴィッド・エー  
アメリカ合衆国カリフォルニア州 94025  
メンロ・パーク、ロレイ・レーン 32  
(72) 発明者 ロツシ, ミシエル・ジエイ  
スイス国エクレパン州シーエイチ-1312、  
ラ・グラヴエイル 2  
(74) 代理人 弁理士 川原田 一穂

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レーザー励起技術を用いる生物学的および他の分析のためのアップコンバート性レポータ

(57) 【要約】

本発明は、たとえば生物学的巨大分子および他のアナライトなどアナライトの鋭敏な検出をプローブ分子をアップコンバート性ラベルにより標識して行うための方法、組成物および装置を提供する。アップコンバート性ラベルは照明源からの照射線を吸収すると共に1つもしくはそれ以上の高い周波数で発光して、向上した信号とノイズとの比を与えると共にバックグラウンド試料自己蛍光発性を実質的に排除する。これら方法、組成物および装置は複数アナライトの鋭敏な検出と各種の臨床的および環境的試料採取技術とに適している。

**【特許請求の範囲】**

1. アップコンバート性ラベルをプローブに付着させて標識プローブを形成し；

標的アナライトを含有する試料を結合条件下で標識プローブと接触させて標識プローブー標的複合体を形成し；

未結合の標識プローブを試料中の標識プローブー標的複合体から除去し；

ラベル励起波長で照明すると共に少なくとも1つのラベル発光波長の発光を検出することにより標識プローブー標的複合体を検出する

ことを特徴とする試料におけるアナライトの検出方法。

2. 前記アップコンバート性ラベルが、ホスト材料中の少なくとも1種の稀土類元素を含むアップコンバート性無機燐である請求の範囲第1項に記載の方法。

3. アップコンバート性無機燐がナトリウム イットリウム フルオライド イッテルビウム エルビウムもしくはイットリウム イッテルビウム エルビウム オキシスルフィドからなる請求の範囲第2項に記載の方法。

4. プローブが抗体、ポリヌクレオチド、ポリペプチドホルモン、ストレプトアビジン、スタフィロコッカス・アウレウス蛋白A、レクチンおよび抗原よりなる群から選択される請求の範囲第1項に記載の方法。

5. プローブを共有もしくは非共有結合により標識に付着させる請求の範囲第1項に記載の方法。

6. プローブがストレプトアビジンもしくはアビジンである請求の範囲第5項に記載の方法。

7. 未結合の標識プローブを試料中の標識プローブー標的複合体から除去する工程を、水溶液により試料を洗浄して可溶性の未結合標識プローブを除去することにより行う請求の範囲第1項に記載の方法。

8. 標識プローブー標的複合体を固体支持体に固定化する請求の範囲第7項に記載の方法。

9. 標識プローブー標的複合体が結合サンドイッチ複合体である請求の範囲第8項に記載の方法。

10. 標的アナライトがポリヌクレオチド、ポリペプチド、ウィルス、微生物、ハプテン、哺乳動物細胞、ステロイドホルモン、グリコ蛋白、リポ蛋白、ビオチニル化磁性ビーズおよび医薬品よりなる群から選択される請求の範囲第1項に記載の方法。

11. ラベル励起波長で照明する工程を赤外レーザーダイオードもしくは発光ダイオードで行う請求の範囲第1項に記載の方法。

12. 赤外レーザーダイオードもしくは発光ダイオードがパルス照明を発する請求の範囲第11項に記載の方法。

13. 赤外レーザーダイオードもしくは発光ダイオードを直流変調により脈動させる請求の範囲第12項に記載の方法。

14. 少なくとも1つのラベル発光波長の発光を検出する工程をタイムゲートもしくはロックイン検出により行う請求の範囲第12項に記載の方法。

15. 発光を検出する工程を位相敏感検波により行う請求の範囲第11項に記載の方法。

16. レーザーダイオードもしくは発光ダイオードが960～980nmの範囲および約1500nmにピーク発光を有する請求の範囲第11項に記載の方法。

17. 発光を検出する工程を光電子増倍管、CCD、CIDまたは写真フィルム乳液で行う請求の範囲第1項に記載の方法。

18. 標的アナライトを組織学的組織セクションまたは固体支持体に固定化させる請求の範囲第1項に記載の方法。

19. 標的アナライトを含有する試料を結合条件下でプローブと接触させてプローブ-標的複合体を形成し；

アップコンバート性ラベルをプローブ-標的複合体に付着させて標識プローブ-標的複合体を形成し；

未結合のアップコンバート性ラベルを試料中の標識プローブ-標的複合体から除去し；

ラベル励起波長で照明すると共に少なくとも1つのラベル発光波長の発光を検出することにより標識プローブ-標的複合体を検出する



ことを特徴とする試料におけるアナライトの検出方法。

20. 標的アナライトがポリヌクレオチドであり、プローブが実質的な相補配列を有するビオチニル化ポリヌクレオチドであって、結合条件下で標的ポリヌクレオチドに対し特異的にハイブリダイズする請求の範囲第19項に記載の方法。

21. アップコンバート性ラベルがアップコンバート性燐粒子およびストレプトアビジンからなる請求の範囲第20項に記載の方法。

22. プローブが一次抗体であり、ラベルを少なくとも1種の二次抗体を介しプローブに結合させる請求の範囲第19項に記載の方法。

23. 前記二次抗体をビオチニル化すると共に、前記ラベルをストレプトアビジンに結合させる請求の範囲第22項に記載の方法。

24. アップコンバート性燐ラベルをストレプトアビジンと接触させて、ストレプトアビジン被覆されたアップコンバート性燐ラベルを形成し；

前記ビオチニル化された標的をストレプトアビジン被覆されたアップコンバート性ラベルと結合条件下で接触させて標的-ラベル複合体を形成し；

標的-標識複合体を未結合のストレプトアビジン被覆されたアップコンバート性燐ラベルから分離し；

ラベル励起波長で照明すると共に少なくとも1つのラベル発光波長の発光を検出することにより標的-ラベル複合体を検出する

ことを特徴とするビオチニル化標的の検出方法。

25. 標的がビオチニル化磁性ビーズである請求の範囲第24項に記載の方法。

26. アップコンバート性ラベルとプローブとからなる組成物。

27. アップコンバート性ラベルがアップコンバート性無機燐である請求の範囲第26項に記載の組成物。

28. プローブが抗体、アビジン、ストレプトアビジン、スタフィロコッカス・アウレウス蛋白A、抗原およびポリヌクレオチドよりなる群から選択される請求の範囲第27項に記載の組成物。

29. プローブが非共有結合によりアップコンバート性ラベルに付着される請求の範囲第26項に記載の組成物。

30. プローブがストレプトアビジンであり、アップコンバート性無機燐が非共有結合によりプローブに付着される請求の範囲第28項に記載の組成物。

31. ビオチニル化磁性ビーズ、ストレプトアビジン被覆磁性ビーズ、アビジン被覆磁性ビーズまたは免疫グロブリン被覆磁性ビーズをさらに含む請求の範囲第30項に記載の組成物。

32. 第1範囲の波長における励起バンドと第1範囲における波長よりも短い第2範囲の波長における発光バンドとを特徴とするアップコンバート性ルミネセントレポータを有する試料における診断を実施する装置において：

レポータの励起バンドの少なくとも1部と重なる範囲の波長にて発光しうる発生源と；

前記発生源を付勢する手段と；

レポータの発光バンドの少なくとも1部と重なる範囲の波長にて光を検出しうる検出器と；

前記発生源により発光された光の少なくとも1部（第1範囲の波長における光を含むと共に第2範囲の波長における光を排除する）を試料の箇所に向向させる第1手段と；

試料の前記箇所から発散する第2範囲の波長における光を含む光の少なくとも1部を前記検出器に向向させる第2手段と；

第2範囲における波長を含むと共に第1範囲における波長を排除する範囲の波長にて前記検出器に入射する光の強度を示す電気信号を発生する前記検出器に連結させた手段と

を備えることを特徴とする試料における診断の実施装置。

33. 前記検出器が第1および第2範囲における光に応答し；

前記第2指向手段が波長選択部材を備え；

第2範囲における波長を有する光のみが前記検出器に到達する

請求の範囲第32項に記載の装置。

34. 励起バンドが近赤外にあり、発光バンドが可視範囲にある請求の範囲第32項に記載の装置。

35. 前記第1および第2の指向手段が共通の部材を持たない請求の範囲第3

2 項に記載の装置。

36. 前記第 1 および第 2 の指向手段が共通の少なくとも 1 個の部材を有する請求の範囲第 3 2 項に記載の装置。

37. 試料が第 3 範囲の波長における励起バンドと第 4 範囲の波長における発光バンドとを特徴とする第 2 レポータを必要に応じさらに含み、第 1 および第 3 範囲が重ならず、第 2 および第 4 範囲が重ならず：さらに

第 2 レポータの励起バンドの少なくとも 1 部と重なる範囲の波長にて発光しうる第 2 発生源と；

前記第 2 発生源を付勢する手段と；

第 2 レポータの発光バンドの少なくとも 1 部と重なる範囲の波長における光を検出しうる第 2 検出器と；

前記第 2 発生源により発生した光の少なくとも 1 部（第 3 範囲の波長における光を含むと共に第 4 範囲の波長における光を排除する）を試料における箇所に向向させる第 3 手段と；

前記箇所から発散した光の少なくとも 1 部を第 4 範囲の波長における光を含め前記検出器まで指向させる第 4 手段と；

第 4 範囲における波長を含むと共に第 1、第 2 および第 3 範囲における波長を排除する範囲の波長にて前記第 2 検出器に入射する光の強度を示す電気信号を発生させるための前記第 2 検出器に連結した追加手段と

を備える請求の範囲第 3 2 項に記載の装置。

38. 前記第 2 および第 4 指向手段が少なくとも 1 個の波長選択部材を備え；

第 2 範囲における波長を有する光のみが前記最初に挙げた検出器に到達し；

第 4 範囲における波長を有する光のみが前記第 2 検出器に到達する請求の範囲第 3 7 項に記載の装置。

39. 試料が第 3 範囲の波長における励起バンドと第 4 範囲の波長における発光バンドとを特徴とする第 2 レポータを必要に応じさらに含み、第 1 および第 3 範囲が重なると共に第 2 および第 4 範囲が重ならず；さらに

第 2 レポータの発光バンドの少なくとも 1 部と重なる範囲の波長における光を検出しうる第 2 検出器と；

試料における前記箇所から発散する光の少なくとも1部を第4範囲の波長における光を含め検出器まで指向させる第3手段と；

第4範囲における波長を含むと共に第1、第2および第3範囲における波長を排除する範囲の波長にて前記第2検出器に入射する光の強度を示す電気信号を発生させるための前記第2検出器に連結した追加手段と  
を備えることを特徴とする請求の範囲第32項に記載の装置。

40. 発光しうる前記発生源が励起照明の共焦ビームを発生する請求の範囲第32項に記載の装置。

41. 第1および第2のアップコンバート性ルミネセントレポートを有し、第1レポートが第1範囲の波長における励起バンドと第1範囲における波長よりも短い第2範囲の波長における発光バンドとを特徴とし、第2レポートが第3範囲の波長における励起バンドと第4範囲の波長における発光バンドとを特徴とし、第1および第3範囲が重ならず、第2および第4範囲が重なる試料における診断の実施装置において；

第1レポートの励起バンドの少なくとも1部と重なる範囲の波長にて発光しうる第1発生源と；

第2レポートの励起バンドの少なくとも1部と重なる範囲の波長にて発光しうる第2発生源と；

前記第1に挙げた発生源および第2発生源に対し異なる強度パターンを与える手段を含め前記第1および第2発生源を付勢する手段と；

前記第1および第2発生源により発光された光の少なくとも1部（第1および第3範囲の波長における光を含むと共に第2および第4範囲の波長における光を排除する）を試料における箇所まで指向させる手段と；

第2および第4範囲内であるが第1および第3範囲外における波長にて前記検出器に入射する光の各強度を示す第1および第2電気信号を発生させるため、前記異なる強度パターンを識別する手段を包含する、前記検出器と連結した手段とを備える試料における診断の実施装置。

42. 異なる強度パターンを与える前記手段が；

前記第1発生源に連結されて第1周波数における強度を変調する第1波形発生器

と；

前記第 2 発生源に連結されて前記第 1 周波数とは異なる第 2 周波数における強度を変調する第 2 波形発生器とを備える請求の範囲第 4 1 項に記載の装置。

4 3. 前記識別手段が：

前記第 1 波形発生器に連結された第 1 入力ターミナルと前記検出器に連結された第 2 入力ターミナルとを有する第 1 周波数ミキサと；

前記第 2 波形発生器に連結された第 1 入力ターミナルと前記検出器に連結された第 2 入力ターミナルとを有する第 2 周波数ミキサと  
を備える請求の範囲第 4 2 項に記載の装置。

4 4. 異なる強度パターンを与える前記手段が：

第 1 時間間隔に際し前記第 1 発生源を付勢すると共に、前記第 1 時間間隔と重ならない第 2 時間間隔にて前記第 2 発生源を付勢するパルス発生器  
を備える請求の範囲第 4 1 項に記載の装置。

4 5. 前記識別手段が：

前記パルス発生器および前記検出器に連結されて、前記第 1 および第 2 時間間隔につき別々の出力信号を発生するよう作動しうるゲート積算器  
を備える請求の範囲第 4 4 項に記載の装置。

4 6. 第 1 範囲の波長における励起バンドと第 1 範囲における波長よりも短い第 2 範囲の波長における発光バンドとを特徴とするアップコンバート性ルミネセントレポータを含む試料における診断の実施方法において：

レポータの励起バンド内にある範囲の波長にて発光しうる発生源を設け；

レポータの発光バンド内にある波長にて光を検出しうる検出器を設け；

前記発生源により発光された光を試料における箇所に向向させ；

試料における前記箇所から発散する光を検出器に向向させ；

第 2 範囲における波長を含むと共に第 1 範囲における波長を排除する範囲の波長にて光の強度を示す電気信号を発生させる

ことを特徴とする試料における診断の実施方法。

4 7. 励起バンドが近赤外にあり、発光バンドが可視範囲にある請求の範囲第 4 6 項に記載の方法。

48. 無機アップコンバート性燐に付着した少なくとも1種の蛍光性有機染料分子を含む組成物。

49. 蛍光性有機染料分子がローダミン、シアニン、キサンテン、アクリジン、オキサジン、ポルフィリンおよびフタロシアニンよりなる群から選択される請求の範囲第48項に記載の組成物。

50. スペクトルの赤外、近赤外もしくはウルトラレッド部分における励起波長で照明した際に光触媒細胞毒性を発生させることによる光力学療法のため組成物を患者に投与する請求の範囲第48項に記載の組成物。

51. 標的アナライトの存在を検出するための均一分析の実施方法において：アップコンバート性ラベルをプローブに付着させて標識プローブを形成し；標的アナライトを含有する試料を結合条件下で標識プローブと接触させて標識プローブー標的複合体を形成し；標識プローブー標的複合体を、標識プローブー標的複合体が未結合標識プローブと対比して、接触表面に優先的に局在する接触表面と接触させ；

ラベル励起波長で照明すると共に少なくとも1つのラベル発光波長の発光を検出することにより前記接触表面における標識プローブー標的複合体を検出することを特徴とする均一分析の実施方法。

52. 接触表面に焦点を有すると共に接触表面以外の箇所にて発散する共焦ビームで照明することにより検出工程を行う請求の範囲第51項に記載の方法。

53. 前記プローブー標的複合体を未結合標識プローブと対比し、磁性ビーズに優先的に局在させる、前記接触表面への磁性ビーズの磁気局在化；沈降プローブー標的複合体を未結合標識プローブと対比し接触表面に優先的に局在させる、未結合標識プローブからのプローブー標的複体の重力沈降；または前記プローブー標的複合体を未結合標識プローブと対比し接触表面に優先的に局在させる、接触表面にわたる濾過によりプローブー標的複合体を接触表面に優先的に局在させる請求の範囲第51項に記載の方法。

**【発明の詳細な説明】**

レーザー励起技術を用いる生物学および他の分析のためのアップコンバート性レポータ

**発明の背景**

本発明は一般に、たとえば蛋白質、炭水化物、核酸、細菌、ウィルスおよび真核性細胞のような可溶性、懸濁もしくは微粒子物質またはアナライトを検出するための分析法に有用な検出可能なラベルおよび組成物に関し、より詳細にはルミネセント（燐光性もしくは蛍光性）ラベルを含む組成物および方法に関するものである。

たとえば蛋白質、薬物およびポリヌクレオチドのような特定の巨大分子物質を検出する方法は、特に正常および異常な組織試料および遺伝子物質の分子組成を特性化するため生物学および医学において極めて価値ある分析技術であると証明されている。種々異なる多くの種類のこの種の検出法は、生物医学研究および臨床実験医学にて広く使用されている。この種の検出法の例は次のものを包含する：免疫分析、顕微鏡検査のための免疫化学染色、蛍光活性化細胞選別（FACS）、核酸ハイブリッド化、水試料採取、空気試料採取など。

典型的には、検出法は特定の標的巨大分子物質に結合して検出可能な信号を発生する少なくとも 1 種の分析試薬を用いる。これら分析試薬は典型的には次の 2 種の成分を有する：（1）プローブ巨大分子、たとえば高度の特異性および親和性にて標的巨大分子に結合しうる抗体もしくはオリゴヌクレオチド、並びに（2）たとえば放射性同位元素または共有結合した蛍光染料分子のような検出可能なラベル。一般にプローブ巨大分子の結合性がこの検出法の特異性を規定し、関連するラベルの検出性がこの検出法の感度を決定する。検出の感度は用いるラベルの種類、並びにこれを検出すべく入手しうる装置の品質および種類の両者に関係する。

たとえば放射性免疫分析（RIA）は、生物学的巨大分子の検出および定量するため用いられる最も鋭敏かつ特異的な分析法である。放射性免疫分析技術は、

たとえばポリペプチド、薬物、ステロイドホルモン、ポリヌクレオチド、代謝物

および腫瘍マーカーのような生物学的試料における微量の特定アナライトの検出および測定に使用されている。放射性免疫分析法は、分析試薬としての1種もしくはそれ以上の放射性同位元素で標識された免疫グロブリンを用いる。付着した放射性同位元素ラベルの減衰により発生する放射線 ( $\alpha$ ,  $\beta$  もしくは  $\gamma$ ) は、各種の放射能分析法により検出および定量しうる信号として作用する。

放射性同位元素ラベルはたとえば次のような数種の利点を有する：極めて高い検出感度、極めて低いバックグラウンド信号、および精密な放射能分析装置（シンチレーションおよび  $\gamma$  カウンタ）または安価かつ鋭敏な自動放射能写真技術による正確な測定。しかしながら、放射性同位元素ラベルは次のような幾つかの欠点をも有する：潜在的な健康被害、処分の困難性、特殊な認可要件、および不安定性（放射能減衰および放射能分解）。さらに放射性同位元素ラベルが典型的には電磁スペクトルの紫外、赤外もしくは可視部分にて強力（すなわち非-セレンコフ）信号を発生しないと言う事実は、放射性同位元素を一般にたとえば顕微鏡検査、画像分光分析および流動血球測定のような光学的検出法を用いる用途のラベルとして不適当にする。

これらおよび他の理由で臨床化学、水および空気の監視、並びに生物医学研究の分野は、放射性同位元素を必要としない代案の検出可能なラベルを求めている。この種の非放射性ラベルの例は次のものを包含する：（1）発色性基質から不溶性着色物質への変換を触媒する酵素（たとえばアルカリホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ）または蛍光性もしくはルミネセント物質を生成する反応を触媒する酵素（たとえばルシフェラーゼ）[ベックおよびコスター（1990）、アナリチカル・ケミストリー、第62巻、第2258頁；I. デュラント（1990）、ネイチャー、第346巻、第297頁；「生物ルミネセントおよび化学ルミネセントの分析用途」（1984）、クリッカ等（編）、アカデミック・プレス社、ロンドン]、並びに（2）特定の吸収波長スペクトルにて電磁エネルギーを吸収し、次いで1つもしくはそれ以上の長い（すなわちエネルギーの低い）波長にて可視光を発する直接的蛍光性ラベル（たとえばフルオレスセインイソチオシアネート、ローダミン、カスケードブルー）



。

酵素と燐光性／蛍光性もしくは比色検出可能なラベルメとの使用は信号増幅の顕著な利点を与える。何故なら、単一の酵素分子は典型的には発色性基質から検出可能な物質への変換を触媒する持続性の能力を有するからである。適する反応条件および培養時間により単一の酵素分子は多量の生成物を生産し、したがって相当な信号増幅を与えることができる。しかしながら、ラベルとして酵素を用いる検出法は、着色物質の生成および検出に適する条件下で、適切な基質濃度を与えるには追加工程および試薬を必要とする点で不利である。さらに、酵素ラベルに基づく検出法は典型的には、検出可能量の生成物を生ぜしめるには長時間を必要とすると共にプローブ分子に付着しない不溶性物質を発生する。

酵素ラベルの他の欠点は、酵素標識されたプローブにより複数の標的物質を検出するのが困難なことである。2種もしくはそれ以上の個々の酵素ラベル物質につき反応条件および展開時間を最適化するには問題があり、さらに発色性最終生成物には顕著なスペクトル重複がしばしば存在して反応生成物の識別を困難にする。

蛍光性ラベルは酵素ラベルにおける信号増幅の利点を与えないが、蛍光性ラベルは免疫細胞化学にて広く承認されうるような顕著な利点を有する。蛍光性ラベルは典型的には小さい有機染料分子、たとえばフルオレスセイン、テキサスレッドもしくはローダミンであって、たとえば免疫グロブリンまたはスタフィロコッカス・アウレウス蛋白Aのようなプローブ分子に容易に結合することができる。蛍光性分子（発蛍団）は適する励起周波数の光で照明して検出することができ、得られるスペクトル放出は電気光学センサまたは光学顕微鏡により検出することができる。

広範な種類の蛍光染料を入手することができ、励起および発光スペクトルの選択を与える。複数標的の検出および識別を複数プローブ（各プローブ物質は異なる発蛍団に結合する）にて可能にするよう充分異なる発光スペクトルを持った発蛍団を選択することができる。発蛍団のスペクトルは狭いバンド励起および発光スペクトルの選択的検出の両者に基づいて識別しうるので、2種もしくはそれ以上の異なる標的物質を検出すると共に決定することができる [チツス等 (198

2)、ジャーナル・イミュノロジカル・メソッズ、第50巻、第193頁；ニードーロフ等(1989)、サイトメトリー、第10巻、第20頁；J. S. プロエム、アナリチカル・NYアカデミー・サイエンス、第177巻、第414頁]。

残念ながら、蛍光性ラベルを用いる検出法は各種の理由で限られた感度を有する。第1に、通常の発蛍団では非特異的バックグラウンド信号から特異的蛍光信号を識別するのが困難である。最も一般的な発蛍団は幅広い吸収および発光スペクトルを有する芳香族有機分子であって、励起(すなわち吸収)波長よりも長い波長まで最大発光スペクトルが50~100nmだけ赤色に移動する。典型的には、吸収バンドと発光バンドとの両者はスペクトルのUV/可視部分に存在する。さらに、蛍光発光の寿命は一般に1~100nsの程度に短い。残念ながら、有機染料蛍光のこれら一般的特徴は、他の試薬(たとえば固定剤もしくは血清)または自己蛍光性もしくは試料自身により与えられるバックグラウンド信号にも適用しうる[ジョンギンド等(1982)、エキスペリメンタル・セル・リサーチ、第138巻、第409頁；J. E. オービン(1979)、ジャーナル・ヒストケミカル・サイトケミストリー、第27巻、第36頁]。光学レンズおよび反射励起光の自己蛍光性は可視スペクトルにおけるバックグラウンドノイズの付加的発生源である[ベベルロー等(1991)、サイトメトリー、第11巻、第784頁；ベベルロー等(1992)、サイトメトリー、第13巻、第561頁]。したがって、典型的な発蛍団からの特異的蛍光信号の検出限界は、非特異的な蛍光および反射励起光により与えられる顕著なバックグラウンドノイズによって制限される。

感度を制限する有機染料発蛍団の第2の問題は染料分子の光分解(すなわち光漂白)である。すなわちバックグラウンドノイズが比較的低い状況においても、弱い蛍光信号を長い検出時間にわたり積算することがしばしば不可能である。何故なら、染料分子が紫外および近紫外バンドにおける入射光の関数として分解するからである。

しかしながら、蛍光ラベルは各種の用途に魅力的であるため、鋭敏な検出につき有利な性質を有する幾つかの代案発蛍団が提案されている。1つの手段は、非

特異的蛍光性ノイズが減少するスペクトルの遠赤外もしくは近赤外領域にて発光するフィコビリ蛋白アクセプタ分子染料からなる有機染料を用いることである。フィコビリ蛋白は、エネルギー移動メカニズムを介して大きいストークシフトの作用を示す付属分子と組合せて使用される〔米国特許第4,666,862号；オイ等（1982）、ジャーナル・セル・バイオロジー、第93巻、第891頁〕。フィコビリ蛋白ラベルは、励起周波数と発光周波数との間のスペクトル重なり程度を減少させる。他の代案手法は、黄色もしくは赤色領域にて吸収すると共に自己蛍光が減少する赤色もしくは遠赤外にて発光するシアニン染料を使用することである〔ムジャンバール等（1989）、サイトメトリー、第10巻、第11頁〕。

しかしながら、フィコビリ蛋白およびシアニン染料の両者では発光周波数は赤色移動（すなわち周波数低下移動）すると共に発光寿命が短く、したがってバックグラウンド自己蛍光が完全にはノイズ発生源として除去されない。より重要なことに、フィコビリ蛋白およびシアニン染料は幾つかの明確な欠点を有する：（1）赤色、遠赤外および近赤外領域における発光は肉眼による検出につき大して適さず、フィコビリ蛋白およびシアニンラベルを光学蛍光顕微鏡でを使用することを妨げ；（2）シアニン、フィコビリ蛋白および結合付属分子（たとえばアズレA）は光漂白を受け易くかつ他の試薬との望ましくない化学相互作用をもたらす有機分子であり；さらに（3）発光される照射線はダウンコンバート（down-convert）され、すなわち吸収励起光よりも長い波長を有する。たとえばアズレAは632 nmにて吸収すると共に645 nmにて発光する一方、アロフィコシアニンは645 nmにて吸収すると共に655 nmにて発光し、したがって分散励起光からの自己蛍光およびバックグラウンドノイズは除去されない。

提案されている他の代案種類の発光団はダウンコンバート性ルミネセントランタニドキレートである〔ソイニおよびロブグレン（1987）、CRC Crit. Rev. Anal. Chem.、第18巻、第105頁；ライフ等（1977）、クリニカル・ケミストリー、第23巻、第1492頁；ソイニおよびヘミラ（1979）、クリニカル・ケミストリー、第25巻、第353頁；セベウス等（1992）、サイトメトリー、第13巻、第329頁〕。ダウンコンバート

性ランタニドキレートは大きい下方向のストークス移動（すなわち発光最大は典型的には吸収最大よりも少なくとも100 nm大である）を有する無機燐であって、分散励起光からの信号の識別に役立つ。ランタニド燐は、タイムゲート検出法に使用しうるよう充分長い（すなわち1  $\mu$ sより大）発光寿命を有し、短寿命の自己蛍光および分散励起光によりもたらされるノイズを減少させうるが、完全には除去しえない。さらにランタニド燐は狭いバンド発光を有し、特にレーザー励起源を用いる場合はバックグラウンドノイズおよび分散励起光に対し波長識別を容易化する（ライヒシュタイン等（1988）、アナリチカル・ケミストリー、第60巻、第1069頁）。最近、ダウンコンバート性ランタニドキレートを用いる酵素増幅のランタニドルミネセントが蛍光標識技術として提案されている〔エバンゲリスタ等（1991）、アナリチカル・バイオケミストリー、第197巻、第213頁；グジナーテンプレトン等（1991）、クリニカル・ケミストリー、第37巻、第1506頁〕。

最近までダウンコンバート性ランタニド燐は、その水性（酸素化）溶液における量子効率が細胞化学染色には不適にするような低さを有するという顕著な欠点を有した。ベベルロー等（上記）は、時間分解法により検出しうる信号を水溶液中で発生する特定のダウンコンバート性ランタニド燐（ヨーロピウムで活性化されたイットリウムオキシスルフィド）を記載している。セベウス等（上記）は、時間分解の蛍光顕微鏡法と組合せたダウンコンバート性ヨーロピウムキレートをを用いて即発蛍光からの信号を排除することにより自己蛍光を減少させている。タンケ等（米国特許第5,043,265号）は、免疫グロブリンおよびポリヌクレオチドのためのラベルとしてダウンコンバート性燐粒子を報告している。

しかしながら、ベベルロー等のダウンコンバート性ランタニド燐およびセベウス等のヨーロピウムキレートは、紫外範囲にある最大励起波長を必要とし、したがって顕著な試料自己蛍光およびバックグラウンドノイズ（たとえば血清および／または固定剤の蛍光、励起光分散、および屈折など）を発生し、これらは排除せねばならない（たとえばフィルタまたは時間ゲートの信号排除により）。さらに、紫外線照射による励起は核酸および他の生物学的巨大分子を損傷し、生存細胞の生存力を保持すると共に細胞構造（たとえばFACS、サイトーアーキテクチ

ュラルーマイクロコピー）を保持することが望ましい免疫細胞化学用途につき重大な問題を提起する。

強力に集中するレーザーパルスの流れを用いるUV励起性蛍光有機染料（ヘキスト33258）の2-フォトン励起につき、レーザー走査蛍光顕微鏡法が使用されている〔デンク等（1990）、サイエンス、第248巻、第73頁〕。デンク等により使用された有機発蛍団は、画像形成の過程で強力な高集中レーザー光により顕著に光漂白された。

したがって、特定ラベル信号の鋭敏な光学的および／または顕微鏡的検出を可能にすると共に非特異的なバックグラウンドノイズをほぼ完全に排除し、しかも生存完全細胞および水性もしくは空気性環境に対し適合しうるようなラベルおよび検出法につき相当なニーズが当業界に存在する。

本明細書に挙げた引例は本出願の出願日前に開示されたものである。しかしながら、これらは決して本発明の特許性を妨げるものでない。

### 発明の要点

本発明は、多重標的検出および標的識別につき使用しうる超鋭敏な細胞、生物学的巨大分子および他のアナライトの検出を可能にするラベル、検出法および検出装置を提供する。

本発明のアップコンバート性（up-converting）標識は、非特異性バックグラウンド自己蛍光をほぼ完全に排除しうると共に典型的にはそれぞれスペクトルの赤外もしくは可視部分に存在する励起波長および発光波長を特徴とし、したがって紫外線の強力な損傷作用を防止する。本発明のアップコンバート性ラベルは長波長の励起照射線（たとえば近赤外）を励起波長の約 $1/2 \sim 1/3$ の波長の発光照射線まで変換する。可視範囲におけるバックグラウンド蛍光は近赤外の励起波長を用いれば無視しうるので、アップコンバート性ラベルの使用は実質的にバックグラウンドなしの信号検出を可能にする。

要するに、本発明はマルチフォトン励起を可能にすると共にアップシフトした発光放出スペクトルを有するルミネセント物質の使用を与える。本発明の一具体例においては、アップコンバート性燐（すなわち低周波数バンドにて複数フォトン吸収すると共に、高周波数バンドで発光する）をたとえば免疫クロブリン、

ポリヌクレオチド、ストレプトアビジン、蛋白A、リセプタリガンドまたは他のプローブ分子のような1種もしくはそれ以上のプローブに結合しうるラベルとして使用する。他の具体例においては、アップコンバート性有機染料がラベルとして作用する。本発明の有機染料ラベルおよび燐ラベルは自動診断試験、顕微鏡画像形成用途およびコード化粒子検出などの多くの用途に極めて適している。

本発明の特性は、これら方法を実施する装置における相当な融通性を与える。一般的に、励起源は任意便利な光原とすることができ、安価な近赤外レーザーダイオードまたは発光ダイオード（LED）を包含し、検出器は任意便利な検出器、たとえばフォトダイオードとすることができる。単一レポータの場合、装置はレポータの励起バンドにおける1つもしくはそれ以上の波長にて発光しうるレーザーダイオード、およびレポータの発光バンドにおける少なくとも幾つかの波長に対し敏感な検出器を包含する。レーザー光は好ましくは試料における小さい領域に集中し、この領域から発する光を集めて検出器に指向させる。発光バンドにて光の強度を示す電気信号は、存在するレポータ量の尺度を示す。検出器のスペクトル応答に応じ、フィルタを設けて励起光を阻止する必要がある。

複数レポータの同時検出は、少なくともリポータが異なる励起バンドもしくは異なる発光バンドを有する場合に可能である。励起バンドが異なる場合、それぞれ適する波長で発光する多重レーザーダイオードを波長分割マルチプレクサまたは他の適する技術、たとえば周波数標識、周波数変調およびロックイン検出装置を用いて組合せる。発光バンドが異なる場合（励起バンドは異なっても異ならなくてもよい）、異なる発光バンドにおける光を分離して多重検出器に送信する。発光バンドが重なる場合は単一の検出器を使用しうるが、他の検出技術も使用される。1例は、1個のみのレポータが所定時間で発光するよう時間マルチプレキシング技術を用いることである。或いは、異なるレーザーダイオードを異なる特性周波数で変調し、ロックイン検出を行うことができる。

本発明の検出法および検出装置は、アップコンバート性ラベルの有利な特徴であるバックグラウンドノイズ（たとえば自己蛍光性、血清／固定剤蛍光、励起光散乱）のほぼ完全な不存在の技術を開発してアップコンバート性燐およびアップコンバート性有機染料の超鋭敏な検出を可能にする。本発明の幾つかの具体例は、

検出感度を最適化し、複数試料を識別し、かつ／または単一試料における複数プローブを検出するためのタイムゲート検出および／または波長ゲート検出を用いる。位相敏感検波を用いて、アップコンバート性媒質に起因する信号と異なる位相シフトを有するバックグラウンドノイズ（たとえば自己蛍光）との間の識別を与えることもできる。

たとえば赤色吸収性染料のようなアップコンバート性有機染料を、染料により吸収された光子を測定しうる一時的電圧まで電極および慣用の電子回路により変換する代案具体例に用いることもできる。2-光子吸収を受けた後、染料を光原（たとえばレーザー）からの他の光子によりイオン化させて短寿命の分子イオンをもたらし、その存在を励起照射の後の一時的光な伝導性を測定して検出および定量することができる。この具体例においては、共鳴マルチ光子イオン化が試料における染料分子の個数および／または濃度の定量測定に用いられる。さらに、照射試料で形成された実質的に全てのフォトイオンは信号に寄与するのに対し、光子は全方向に放出されて1部のみが光学系を用いて回収される。一時的な光電流の測定は光子を比較的簡単かつ安価なセンサ（たとえば電極）で容易に測定される電子信号まで効果的に変換する。

ある具体例において、本発明は1つもしくはそれ以上の個々の周波数における励起照明を発生するための1個もしくはそれ以上の光学レーザー源を用いる。本発明の或る種の具体例において、アップコンバート性ラベルのレーザー照射は、直接的吸収もしくはエネルギー移行を含むレーザー誘起の光化学的過程を介し直接的分子環境を改変することができる。この種のエネルギーの空間制御沈着を用いて局部的損傷を発生させ、かつ／または所定位置の化学環境を検査することができる。この種の具体例において、アップコンバート性ラベルは好ましくは光物理的触媒として作用することができる。

本発明は、化学的もしくは生物学的物質における標的損傷（たとえば触媒作用）の発生方法を与え、ここではプローブを用いて結合アップコンバート性ラベルをプローブにより結合された標的生物学的構造の近くの位置に局在させる。局在化したアップコンバート性ラベルは1つもしくはそれ以上の励起波長により励起されると共に、直接的な細胞毒性もしくは遺伝子毒性（たとえば過酸化物のような

遊離基の発生および／またはチミン-チミン 2 量体の発生による）としうる或いは局所的な光分解化学反応を誘発してラベルの近傍で反応性化学物質をもたらしうる（したがって標的の生物学的物質の近傍で化学物質を発生しうる）短波長にて発光する。すなわち、1 種もしくはそれ以上のアップコンバート性ラベル（たとえばアップコンバート性無機燐）で標識された標的プローブを用いて生物学的構造、たとえば細胞、組織、ネオプラズム、血管構造または他の解剖学的もしくは組織学的構造に標的損傷を与えることができる。

さらに本発明の具体例は、電子ビームまたは十分なエネルギーを有するエネルギー照射の他のビームにより励起しうると共に陰性ルミネセントであるアップコンバート性燐をも包含する。この種の電子刺激ラベルは、超鋭敏な生物分子検出法におけるバックグラウンドを除去するという新規な利点を与える。典型的には、少なくとも 2 個の電子によるアップコンバート性燐の刺激を用いて、可視光または UV バンド発光を生ぜしめる。

さらに本発明は、数種のアップコンバート性燐もしくはアップコンバート性染料のマルチフォトン励起とそれに続くバックグラウンドフリーの蛍光検出とを活用することによる複数標的物質の同時検出に関する。1 具体例においては、1 波長（または狭いバンド幅）にて同時励起を可能にするが各プローブ-ラベル種類に識別可能な蛍光性「指紋」が付与されるよう発光特性が変化する重なった吸収バンドを有する数種の燐／染料を選択する。種々の方法および装置を用いることにより、各燐もしくは染料の存在および濃度を測定することができる。

さらに本発明は、典型的には溶液における 1 種もしくはそれ以上のアナライトの存在および濃度を測定するための生化学的分析法を提供する。この分析法は、アップコンバート性燐および／またはアップコンバート性染料で標識されたプローブの組成物を用いると共に、アナライトと標識プローブとからなる粒子を磁気的および／または光学的に捕獲するための装置を用いる。1 具体例においてはサンドイッチ分析を行い、粒子上に固体化された固定化プローブが所定アナライトに結合して粒子に対する結合アナライトの固定化をもたらす。次いでアップコンバート性ラベルで標識された第 2 プローブが結合アナライトに結合して、粒子に結合したアップコンバート性ラベルを含有する結合サンドイッチ複合体を生成す



ることができる。種々異なるプローブラベルの組合せ物と種々の寸法、色および／または形状の粒子とを異なる固定化プローブおよび／または種々の励起波長とを組合せることにより、複数分析をほぼ同時的に行うことができる。この多重性の利点は、単一試料における複数アナライト物質の検出および定量を可能にする。さらにこれら分析法はたとえば物理的、化学的、生化学的もしくは免疫学的反応のような結合反応を包含する反応の過程を監視するにも有用である。たとえば本発明は、ハイブリダイズ速度論およびハイブリダイズしたポリヌクレオチドの熱力学的安定性を含めリガンド結合反応、ポリヌクレオチドのハイブリダイズ反応などの過程を監視すべく使用することができる。

さらに本発明は、スペクトルの赤外部分に存在するが細胞を顕著には損傷しない励起照射線を用い、流動血球測定により蛍光活性化細胞選別（FACS）を行うための方法、アップコンバート性ラベルおよび標識結合試薬の組成物を提供する。これは、DNA傷害をもたらしかつ細胞を損傷させることが知られた波長を含めスペクトルの紫外部分における励起照明に依存した現在のFACS法よりも顕著な利点を与える。

さらに本発明は、無機アップコンバート性燐に付着した少なくとも1個の蛍光性有機染料分子を含む組成物をも提供する。蛍光性有機染料分子はローダミン、シアニン、キサンテン、アクリジン、オキサジン、ポルフィリンおよびフタロシアニンよりなる群から選択され、必要に応じ重金属と錯体化することもできる。蛍光性有機染料は無機アップコンバート性燐結晶に吸着させることができ、或いは被覆された無機アップコンバート性燐、誘導化されたガラスセラミック・アップコンバート性燐またはマイクロカプセル化された無機アップコンバート性燐に共有付着することもできる。

#### 図面の簡単な説明

第1図は本発明により試料につき診断を行うための代表的装置を示す光学および電子ブロック図であり；

第2A図は単一チャンネルに関連して位相敏感検波を行う装置を示し；

第2B図は波形発生器からの信号により第1および第2レーザーダイオードを変調する装置を示し；

第3図はゲート検出を行う装置を示し；

第4図はそれぞれ $\lambda_1$ および $\lambda_2$ に集中すると共に $\lambda_3$ の近くに重なる発光バンドを有する第1および第2レポータ励起バンドを用いて試料につき診断を行う装置を示し；

第5A、5Bおよび5C図はマルチフォトン励起方式におけるエネルギー状態の転移を図示し；

第6図は手持プローブを用いる小型化装置を示し；

第7A図は多数の結合部位からの放出を検出すべく使用する電荷結合装置（CCD）列の使用を示し；

第7B図はレンズ列と組合せて使用するCCD列を示し；

第8図は光学的捕獲を用いる実施例を示し；

第9図はアップコンバート性燐粒子の染料被覆および包封を図示し；

第10図は標的の粒子速度および水力学もしくは空気力学特性を決定する装置を示し；

第11図は977.2nmの波長最大および約541.0nmにおける発光最大の励起レーザー源によるナトリウムイットリウムフルオライド－イッテルビウム／エルビウムアップコンバート性燐の燐発光スペクトルであり；

第12図は541.0nmに設定された発光収集ウインドーによるナトリウムイットリウムフルオライド－イッテルビウム／エルビウム燐励起スペクトルの励起走査であり；

第13図はナトリウムイットリウムフルオライド－イッテルビウム／エルビウムに関する励起照明を終了した後の541.0nmにおける燐ルミネセントの時間減衰測定であり；

第14図はナトリウムイットリウムフルオライド－イッテルビウム／エルビウム燐に関する励起照明強度の関数としての燐発光強度を示し；

第15図は970nmにて200W/cm<sup>2</sup>で励起した後におけるNa（Y<sub>0.8</sub>Yb<sub>0.12</sub>Er<sub>0.08</sub>）F<sub>4</sub>の0.3μm粒子に関する有効な単一フォトン燐光断面を示し；

第16図はNa（Y<sub>0.8</sub>Yb<sub>0.12</sub>Er<sub>0.08</sub>）F<sub>4</sub>粒子に関する燐光断面の寸法

依存性を示し；

第17A図は970nmレーザー源での励起により誘起されたHepes緩衝塩水におけるアップコンバート性燐レポートの蛍光走査を示し；

第17B図は970nmレーザー源での励起により誘起されたHepes緩衝塩水におけるストレプトアビジン被覆されたアップコンバート性燐レポートの蛍光スペクトル走査を示し；

第18A図は541nmにおける発光の単色検出によるHepes緩衝塩水におけるアップコンバート性燐レポートの励起スペクトル走査を示し；

第18B図は541nmにおける発光の単色検出によるHepes緩衝塩水におけるストレプトアビジン被覆されたアップコンバート性燐レポートの励起スペクトル走査を示し；

第19図は燐濃度とアップコンバート信号との関係を示す（ $Y_{0.86} - Y_{b0.08} - E_{r0.06}$ ）<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Sの試料から得られた積分信号を示し；

第20図はアナライト（たとえば抗原標的）をビオチニル化抗体および固定化抗体に結合させ、アナライトが固体基質超常磁性マイクロビーズに固定化されたサンドイッチ複合体を形成することによる、溶液中のアナライトを検出するためのサンドイッチ免疫分析の1実施例を図示し；

第21図は異なる燐光特性を有する2種の燐で標識された特異的抗体による2種の細胞表面抗原の検出および識別を図示し；

第22図は位相敏感検波のための装置を図示し；

第23図はラベルとして燐を用いると共に捕獲表面における光学繊維照射を用いる競合均一分析を図示し；

第24図はラベルとして燐を用いると共に捕獲表面に集中した収束照射ビームを用いる競合均一抗原捕獲分析を図示し；

第25図はラベルとして燐を用いると共に捕獲表面に集中した収束照射ビームを用い捕獲表面が免疫沈殿物を集める均質免疫沈殿分析を図示する。

#### 特定具体例の説明

#### 定義

特記しない限りここで用いる全ての技術的および化学的用語は本発明が属する

技術分野の当業者により一般的に理解されると同じ意味を有する。個々に説明すると同様または均等な任意の方法および材料を本発明の実施または試験に使用することもできるが、好適方法および材料につき説明する。本発明の目的で次の用語を下記に規定する。

ここで用いる「ラベル」という用語は適する励起条件下で検出可能な光学信号を発生する化学置換基を意味する。励起したラベルにより発生する光学信号は典型的にはスペクトルの近赤外、可視もしくは紫外部分における電磁照射線である。本発明のラベルはアップコンバート性ラベルであって化学置換基が励起周波数にて少なくとも2個のフォトンを吸収すると共に次いで励起周波数よりも高い放出周波数にて電磁エネルギーを放出することを意味する。すなわち、一般に初期励起周波数と最終発光周波数との間には顕著なストロークシフトが存在する。ラベルは一般にプローブに付着して、プローブの存在および／または位置を示すレポータとして作用する。本発明は有機および無機のアップコンバート性ラベルを包含するが、好ましくはアップコンバート性無機ランタニド燐をラベルとして使用する。たとえば本発明の典型的なラベルはサブミクロン寸法のアップコンバート性ランタニド燐粒子である。

ここで用いる「プローブ」という用語は、標的に結合した標識プローブを非特異的に結合した標識プローブ（すなわちバックグラウンド）から識別するのに十分な親和性で1種もしくはそれ以上の標的（たとえば抗原エピトープ、ポリヌクレオチド配列、巨大分子リセプタ）に優先的に結合する結合成分を意味する。一般に、プローブ-標的結合は少なくとも約  $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ 、好ましくは少なくとも約  $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ 、より好ましくは少なくとも約  $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  もしくはそれ以上の結合親和性（ $K_D$ ）を有する非共有相互作用である。抗体は典型的には同族抗原に対し約  $1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$  もしくはそれ以上の結合親和性を有する。限定はしないが、たとえば本発明のプローブは次のものを包含する：抗体、ポリペプチドホルモン、ポリヌクレオチド、ストレプトアビジン、スタフィロコッカス・アウレウス蛋白A、リセプタリガンド（たとえばステロイドもしくはポリペプチドホルモン）、ロイシンジッパーポリペプチド、レクチン、抗原（ポリペプチド、炭水化物、核酸およびハプテンエピトープ）など。

ここで用いる「プローブラベル結合体」および「標識プローブ」という用語は、プローブに付着したラベルからなる組合せ物を意味する。或る種の具体例においては、2個以上のラベル置換基がプローブに付着することもできる。或いは、或る具体例においては2個以上のプローブをラベルに付着させることもできる（たとえば複数抗体分子をサブミクロン寸法の無機アップコンバート性燐ビーズに結合させることができる）。各種の付着化学技術を用いてラベルをプローブに結合させることができ、限定はしないが次の形成を包含する：共有結合、水素結合、イオン結合、静電気相互作用および表面張力（相界）相互作用。さらにラベルの付着は微小球、微小粒子、免疫ビーズおよび超常磁性ビーズ〔ポリサイエンス・インコーポレーション社、ワーリントン、ペンシルバニア州；バングス・ラボラトリーズ・インコーポレーション社・979キーストン・ウェイ、カルメル、IN 46032〕に対するラベルの組込をも包含する。たとえば無機アップコンバート性燐粒子は、励起および放出電磁線の波長範囲にて実質的に透明もしくは半透明のポリマー材料で構成された微小球に包封することができる（米国特許第5,132,242号、参考のためここに引用する）。この種の微小球は、たとえば蛋白のようなプローブへの共有結合につき1個もしくはそれ以上の反応基（たとえばカルボキシル基、アミノ基、ヒドロキシル基またはポリアクロレイン）で表面誘導化して官能化させることができる。プローブラベル結合体はさらに燐キレートをも含むことができる。

ここで用いる「標的」および「標的アナライト」という用語は本発明の方法により分析される目的物を意味する。たとえば限定はしないが、標的はポリペプチド（たとえばhGH、インシュリン、アルブミン）、グリコ蛋白（たとえば免疫グロブリン、スロンボモジュリン、 $\gamma$ -グルタミルトランスぺプチダーゼ；グッドスピード等（1989）、ジーン、第76巻、第1頁）、リボ蛋白、ウィルス、微生物（たとえば病原性細菌、酵母）、ポリヌクレオチド（たとえば細胞ゲノムDNA、現場でのハイブリッド化に関する固定組織学的試料におけるRNA、ナイロンもしくはニトロセルロース膜に固定化されたDNAもしくはRNA、組織もしくは生物液におけるウィルスDNAもしくはRNA）並びに医薬品（すなわちフィジシャンズ・ドラグ・リフェレンスおよび／またはメルク・マニュアル

に記載された処方され或いは市販薬剤、またはたとえば麻酔薬もしくはアナボリックステロイドのような不法物質)を包含する。

ここで用いる「抗体」という用語は免疫グロブリン遺伝子により実質的にコードされる1種もしくはそれ以上のポリペプチドよりなる蛋白を意味する。認められている免疫グロブリン遺伝子は $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\alpha$ 、 $\gamma$  (IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>)、 $\delta$ 、 $\epsilon$  および $\zeta$ 一定領域遺伝子、並びに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子を包含する。全長免疫グロブリン「軽鎖」(約25Kdもしくは214アミノ酸)はNH<sub>2</sub>-末端(約110アミノ酸)にて可変領域遺伝子によりコードされ、さらにCOOH-末端にて $\kappa$ もしくは $\lambda$ 一定領域遺伝子によりコードされる。全長免疫グロブリン「重鎖」(約50Kdもしくは446アミノ酸)も同様に可変領域遺伝子(約116アミノ酸)および他の上記一定領域遺伝子の1種、たとえば $\gamma$ (約330アミノ酸をコードする)によりコードされる。免疫グロブリンの1形態は抗体の基本的構造単位を構成する。この形態は4量体であって、同一の2対の免疫グロブリン鎖で構成され、各対は1個の軽鎖と1個の重鎖とを有する。各対において、軽鎖および重鎖の可変領域は共に抗原に対する結合に関与し、さらに一定領域は抗体イフェクタ機能に関与する。抗体の他に、免疫グロブリンはたとえばFv、FabおよびF(ab')<sub>2</sub>、並びに2官能性ハイブリッド抗体[たとえばランザベチア等、ヨーロピアン・ジャーナル・イミュノロジー、第17巻、第105頁(1987)]のような各種の他の形態、並びに一本鎖[たとえばハストン等、プロシーディング・ナショナル・アカデミー・サイエンスUSA、第85巻、第5879~5883頁(1988)；およびバード等、サイエンス、第242巻、第423~426頁(1988)]にて存在することもできる[一般にフード等、「イミュノロジー」、N. Y. ベンジャーマン、第2版(1984)；並びにフンカピラーおよびフード、ネイチャー、第323巻、第15~16頁(1986)参照]。すなわち必ずしも全ての免疫グロブリンが抗体ではない[U. S. S. N. 07/634, 278号(参考のためここに引用する)およびコ等(1991)、プロシーディング・ナショナル・アカデミー・サイエンスUSA、第88巻、第2869頁(参考のためここに引用する)参照]。

ここで用いる「プローブポリヌクレオチド」という用語は、所定の標的ポリヌクレオチドに特異的にハイブリダイズするポリヌクレオチドを意味する。限定はしないが、たとえばプローブポリヌクレオチドは特定mRNA配列に対応するcDNAの1部、ゲノムクローンの1部、特異的ハイブリッド化につき公知の標的配列に対し十分な配列ホモロジーを有する合成オリゴヌクレオチド（たとえばテロマーリピートTTAGGGもしくはA1u反復配列）、転写RNA（たとえばSP6クローン化用ベクター挿入物から）またはポリアミド核酸〔ニールセン等（1991）、サイエンス、第254巻、第1497頁〕とすることができる。各種の標的ポリヌクレオチドは、標的配列に対する標識プローブポリヌクレオチドのハイブリッド化によって検出することができる。限定はしないが、たとえば標的ポリヌクレオチドは次のものとして行うことができる：ゲノム配列（たとえば構造遺伝子、染色体反復配列、調整配列など）、RNA（たとえばmRNA、hnRNA、rRNAなど）、病原体配列（たとえばウィルスもしくはマイコプラスマDNAもしくはRNA配列）またはトランスジーン配列。

「特異的ハイブリッド化」という用語はプローブポリヌクレオチドと標的ポリヌクレオチドとの間のハイブリッドの形成として規定され、プローブポリヌクレオチドはたとえば少なくとも1個のバンドが標的ポリヌクレオチド配列を有する真核性細胞から作成されたDNAのサウザンブロットで同定されるよう標的DNAに対し優先的にハイブリダイズし、かつ／または完全核におけるプローブポリヌクレオチドは独特もしくは反復配列を特徴とする個々の染色体位置に局在する。或る種の例においては、標的配列が2個以上の標的ポリヌクレオチド物質に存在することができる（たとえば特定標的配列は遺伝子群の複数因子または既知の反復配列に存在することができる）。最適ハイブリッド化条件は標的とするポリヌクレオチドおよび標的の配列組成および長さ、並びに実施者により選択される実験法に応じて変化することが明らかである。種々の指針を用いて、適するハイブリッド化条件を選択することができる〔マニアチス等、モレキュラ・クローニング：ラボラトリー・マニュアル（1989）、第2版、コールド・スプリング・ハーバー、N. Y.、並びにベルガーおよびキンメル、メソッズ・イン・エンチモロジー、第152巻、「分子クローニング技術に対する指針」（1987）、

アカデミック・プレス・インコーポレーション社、サンジエゴ、CA；デュン等（1989）、ジャーナル・バイオロジカル・ケミストリー、第264巻、第13057頁；さらにグッドスピード等（1989）、ジーン、第76巻、第1頁参照】。

ここで用いる「ラベル励起波長」という用語は、アップコンバート性ラベルにより吸収された際にアップコンバート性ラベルから検出可能な蛍光発光を発する電磁線波長を意味し、蛍光発光はラベル励起波長よりも短い波長（すなわちより高い周波数の照射線）を意味する。ここで用いる「ラベル発光波長」という用語は、1つもしくはそれ以上の励起波長でアップコンバート性ラベルを照明した後、に或いはそれと同時にアップコンバート性ラベルから発光する波長を意味する。アップコンバート性ラベルのラベル発光波長は対応の励起波長よりも短い（すなわち、より高い周波数の照射線）。ラベル励起波長とラベル発光波長との両者は個々のアップコンバート性ラベルに特性的であり、簡単な励起および発光走査を行って容易に決定される。

#### 発明の要点

本発明は、励起波長により励起され、次いでアップシフト周波数（すなわち励起照射線よりも高い周波数）にて電磁線を発する蛍光ラベルを包含する。

本発明によれば、アップコンバート性無機燐および／またはアップコンバート性有機染料からなるラベルが種々の用途に提供される。本発明のアップコンバート性ラベルは1種もしくはそれ以上のプローブに付着されて、プローブの位置のレポータ（すなわち検出可能なマーカー）として作用することができる。アップコンバート性ラベルはたとえば抗体、ストレプトアビジン、蛋白A、細胞リセプタのポリペプチドリガンド、ポリヌクレオチドプローブ、薬物、抗原、毒素などの各種のプローブに付着することができる。プローブに対するアップコンバート性ラベルの付着は、各種の結合化学技術を用いて特定プローブの性質に応じ行うことができる。限定はしないが、たとえばマイクロクリスタリン質アップコンバート性ランタニド燐粒子を微粉碎に際しポリカルボン酸（たとえばアディクションXW 330、ヘキスト社、フランクフルト、ドイツ国）で被覆し、各種の蛋白（たとえば免疫グロブリン、ストレプトアビジンもしくは蛋白A）を燐粒子の表



面に物理的に吸着させることができる〔ベベルロー等（1991）、上記、参考のためここに引用する〕。或いは、限定はしないが次のものを包含する各種の無機燐被覆技術を用いることができる：噴霧乾燥、プラズマ沈着、並びに燐粒子に付着され或いは酸化珪素とアップコンバート性燐組成物とからなるガラスセラミック燐粒子に組込まれた $-SiOH$ 部分に対するシラン結合剤により付着した官能基（たとえば $-COOH$ 、 $-NH_2$ 、 $-CONH_2$ ）での誘導化。ガラスセラミック燐粒子は、たとえばアミノ基をリンカー分子におけるガラスセラミック表面に結合させる目的でアミノプロピルトリエトキシシランによりアミノ化しうるが、他の $\omega$ -官能化シランを用いて他の官能基を付着させることもできる。たとえば蛋白もしくはポリヌクレオチドのようなプローブを次いで直接に共有結合により、たとえばシロキサン結合もしくは炭素-炭素結合を介し、燐粒子の表面に共有結合もしくは吸着されたリンカー分子（たとえば有機官能性シリル化剤）に共有結合させてガラスセラミック燐に付着させることができる。

マイクロクリスタリン質アップコンバート性燐粒子は典型的には直径が約 $3\mu m$ 以下、好ましくは直径が約 $1\mu m$ 以下（すなわちサブ $\mu m$ ）、より好ましくは直径が $0.1\sim 0.3\mu m$ もしくはそれ以下である。一般に燐粒子をできるだけ小さくすると共に検出可能な信号を発生するのに十分な量子変換効率を保持することが最も好ましい。しかしながら、任意特定の用途につき、使用すべき燐粒子の寸法は実施者の判断で選択すべきである。たとえば、或る種の用途（たとえば少量の細胞表面抗原の検出）は、小さい必要はないが高い変換効率および／または吸収断面を持たねばならない高感度の燐ラベルを必要とするのに対し他の用途（たとえば浸透化した細胞における多量の核抗原の検出）は、細胞下構造に容易に拡散浸透しうるが高変換効率を持たなくてもよい極めて小さい燐粒子を必要とする。したがって無機燐粒子の最適寸法は用途に依存し、本発明の各種の燐に関する量子効率データに基づいて実施者により選択される。この種の変換効率データは入手しうる刊行物（たとえばハンドブックおよび公開された引例）から得ることができ、或いは量子変換効率を粒子寸法の関数として測定する標準曲線を作成して得ることもできる。たとえば小燐粒子の高感度検出を必要とするような或る種の用途では、赤外レーザーダイオードが励起源として好適に選択される。

アップコンバート性燐の性質については後に詳細に説明するが、これは関与する基本メカニズムを要約するのに有用である。アップコンバージョン (up-conversion) は、稀土類イオンを或る種の結晶物質中に含有する或る種の材料で生ずることが判明した。たとえばイッテルビウムおよびエルビウムは、たとえばバリウム-イットリウム-フルオライドのような燐ホスト材料において活性化剤カップルとして作用する。イッテルビウムイオンは吸収剤として作用し、エネルギーを非放射的に移行させてエルビウムイオンを励起させる。したがって、発光はエルビウムイオンのエネルギーレベルの特徴である。

#### アップコンバート性マイクロクリスタリン燐

本発明は各種のアップコンバート性無機燐を用いて実施しうるが、好適具体例はそれぞれ少なくとも1種の活性化剤カップルでドーピングされた数種の異なる燐ホスト材料の1種から誘導された1個もしくはそれ以上の燐を用いる。適する燐ホスト材料は次のものを包含する：ナトリウムイットリウムフルオライド ( $\text{NaYF}_4$ )、ランタンフルオライド ( $\text{LaF}_3$ )、ランタンオキシスルフィド、イットリウムオキシスルフィド、イットリウムフルオライド ( $\text{YF}_3$ )、イットリウムガレート、イットリウムアルミニウムガーネット、ガドリニウムフルオライド ( $\text{GdF}_3$ )、バリウムイットリウムフルオライド ( $\text{BaYF}_5$ 、 $\text{BaY}_2\text{F}_8$ ) およびガドリニウムオキシスルフィド。適する活性化剤カップルは次のものから選択される：イッテルビウム/エルビウム、イッテルビウム/ツリウムおよびイッテルビウム/ホルニウム。アップコンバージョンに適する他の活性化剤カップルも使用することができる。これらホスト物質と活性化剤カップルとの組合せにより、少なくとも3種の異なる発光スペクトル (赤色、緑色および青色可視光) を有する少なくとも3種の燐が得られる。一般に、吸収剤はイッテルビウムであり、発光中心は次のものから選択することができる：エルビウム、ホルミウム、テルビウムおよびツリウム。しかしながら、本発明の他のアップコンバート性燐は他の吸収剤および/または発光剤を含有することもできる。吸収剤と放出性中心とのモル比は典型的には少なくとも約1:1、より一般的には少なくとも約3:1~5:1、好ましくは少なくとも約8:1~10:1、より好ましくは少なくとも約11:1~20:1、典型的には約250未満:1、一般に約100

未満：1、より一般的には約50未満：1～25：1であるが、所望の特性（たとえば化学特性、製造効率、吸収断面、励起波長および発光波長、量子効率または他の考慮）に基づき実施者により種々の比を選択することができる。選択する比は一般に、選択される特定の吸収剤－発光剤カップルにも基づき、所望の特性に応じ基準値から計算することができる。

吸収剤（たとえばイッテルビウム）と発光中心（たとえばエルビウム、ツリウムもしくはホリミウム）との最適比は特定の吸収剤／発光剤カップルに応じて変化する。たとえばYb：Erカップルにつき吸収剤：発光剤の比は典型的には約20：1～約100：1の範囲であるのに対し、Yb：TmおよびYb：Hoカップルにつき吸収剤：発光剤の比は典型的には約500：1～約2000：1の範囲である。これらの異なる比は、結晶におけるYbレベルに対するEr、TmもしくはHoの異なる対応エネルギーレベルに起因する。大抵の用途にて、アップコンバート性燐は便利には約10～30%のYbを含み、さらに約1～2%のEr、約0.1～0.05%のHoもしくは約0.1～0.05%のTmのいずれかを含むが、他の組成も用いることができる。

本発明の幾つかの具体例は、約950～1000nm、好ましくは約960～980nmの赤外線により最適に励起される無機燐を用いる。限定はしないが、たとえば式 $YF_3 : Yb_{0.10} Er_{0.01}$ のマイクロクリスタリン無機燐は約980nmの励起波長にて最大ルミネセント強度を示す。本発明の無機燐は典型的には、可視範囲にある発光最大を示す。たとえば特定の活性化剤カップルは特徴的な発光スペクトルを有する。イッテルビウム－エルビウムカップルは可視スペクトルの赤色もしくは緑色部分に燐ホストに応じて発光最大を示す。イッテルビウム－ホルミウムカップルは一般に緑色部分で最大発光し、イッテルビウム－ツリウムは典型的には青色範囲に発光最大を有し、さらにイッテルビウム－テルビウムは一般に緑色範囲で最大発光する。たとえば $Y_{0.80} Yb_{0.19} Er_{0.01} F_2$ はスペクトルの緑色部分で最大発光する。

種々の組成のアップコンバート性無機燐結晶が本発明での使用に適しているが、本発明を限定するものでなくたとえば次の組成が一般に適している：

$Na (Y_x Yb_y Er_z) F_4$ ： xは0.7～0.9であり、yは0.09

～0.29であり、 $z$ は0.05～0.01であり；

$\text{Na}(\text{Y}_x\text{Yb}_y\text{Ho}_z)\text{F}_4$ ： $x$ は0.7～0.9であり、 $y$ は0.0995～0.2995であり、 $z$ は0.0005～0.001であり；

$\text{Na}(\text{Y}_x\text{Yb}_y\text{Tm}_z)\text{F}_4$ ： $x$ は0.7～0.9であり、 $y$ は0.0995～0.2995であり、 $z$ は0.0005～0.001であり；

$(\text{Y}_x\text{Yb}_y\text{Er}_z)\text{O}_2\text{S}$ ： $x$ は0.7～0.9であり、 $y$ は0.05～0.12であり、 $z$ は0.05～0.12である。

$(\text{Y}_{0.86}\text{Yb}_{0.08}, \text{Er}_{0.06})_2\text{O}_3$ が比較的効率的なアップコンバート性燐材料である。

限定はしないが例示の目的でイッテルビウム(Yb)－エルビウム(Er)ドーパされたイットリウムオキシスルフィドは950nmでの励起の後に緑色にて発光する。これらは非線状燐であって、イッテルビウムは2個の950nmフォトンにつき「アンテナ」(吸収剤)として作用し、そのエネルギーを発光剤(活性化剤)として作用するエルビウムに移行させる。燐の臨界的な粒子寸法は緑色発光に関する量子収率および一般に約1～10%、より好ましくは約2～5%の範囲にあるYbとErとの両者のドープレベルにより与えられる。典型的なYb：Er燐結晶は約10～30%のYbと約1～2%のErとを含む。すなわち、数千のフォーミュラ単位を有する燐粒子は、典型的なレーザー照射時間に際し少なくとも1個もしくはそれ以上のフォトンの放出を確保する。しかしながら、吸収と放出との間の非直線的関係は、励起波長における強力な照明が極めて小さい燐粒子(すなわち約0.3μm未満)を用いる具体例にて満足な信号を得るのに必要であることを示す。さらに、極めて小さい燐粒子を生成させて量子変換効率を最大化させるには、活性化剤／放出剤カップルのドーピングレベルを増加させることが一般に望ましい。

稀土類活性化剤を有する無機マイクロクリスタリン燐は一般に狭い吸収およびライン発光スペクトルを有する。ライン発光スペクトルは稀土類イオン内のf－f転移に基づく。これらは遮蔽内部転移であって、狭いライン発光をもたらす。

たとえば高感度検出が必要とされる或る種の用途において、たとえば赤外レーザー源(たとえば連続波(CW)もしくはパルス半導体レーザーダイオード)の

ような市販の発生源により強力な照明を得ることができる。たとえばマイクロクリスタリン燐粒子を極めて小さくせねばならずかつ量子変換効率が低いような用途において、強力なレーザー照明は信号を増大させると共に検出時間を減少させることができる。或いは、本発明の或る種の用途は固有の低い量子変換効率を有する燐組成物（たとえば低ドープレベルの活性化剤カップル）を必要とするが、他の所望の特徴（たとえば製造効率、誘導化の容易さなど）を有する。この種の低効率のアップコンバート性燐は好ましくは物質の吸収最大における或いはそれに近い（約25～75 nm）の周波数にてレーザー照明により励起される。アップコンバート性燐以外からはもはや他の光が系で発生しないという事実は、特に励起照射源として強力なレーザー照明を使用する場合、極めて敏感な信号検出を可能にする。たとえばアップコンバート性燐によるフォトンエネルギーのアップコンバージョンの独特な性質は、マイクロクリスタリン無機燐の極めて小さい粒子の検出を可能にする。超感度レポータとしての特に細胞内レポータとしての燐の実際的使用については、燐の粒子寸法をできるだけ小さくすることが重要であり（典型的には約0.3未満～0.1  $\mu\text{m}$ ）、これにはレーザー励起のアップコンバート性燐が極めて適している。

たとえばアップコンバートしうる各種の燐材料組成物が、第I表に示すように本発明での使用に適している。

第 I 表：燐材料組成物

| ホスト材料                | 吸収剤イオン  | 発光剤イオン | 色  |
|----------------------|---------|--------|----|
| オキシスルフィド ( $O_2 S$ ) |         |        |    |
| $Y_2 O_2 S$          | イッテルビウム | エルビウム  | 緑色 |
| $Gd_2 O_2 S$         | イッテルビウム | エルビウム  | 赤色 |
| $La_2 O_2 S$         | イッテルビウム | ホルミウム  | 緑色 |
| オキシハライド ( $O X_y$ )  |         |        |    |
| $YOF$                | イッテルビウム | ツリウム   | 青色 |
| $Y_3 OC17$           | イッテルビウム | テルビウム  | 緑色 |
| フルオライド ( $F_x$ )     |         |        |    |
| $YF_3$               | イッテルビウム | エルビウム  | 赤色 |
| $GdF_3$              | イッテルビウム | エルビウム  | 緑色 |
| $LaF_3$              | イッテルビウム | ホルミウム  | 緑色 |
| $NaYF_3$             | イッテルビウム | ツリウム   | 青色 |
| $BaYF_5$             | イッテルビウム | ツリウム   | 青色 |
| $BaY_2 F_8$          | イッテルビウム | テルビウム  | 緑色 |
| ガレート ( $G a_x O_y$ ) |         |        |    |
| $YGaO_3$             | イッテルビウム | エルビウム  | 赤色 |
| $Y_3 Ga_5 O_{12}$    | イッテルビウム | エルビウム  | 緑色 |
| シリケート ( $Si_x O_y$ ) |         |        |    |
| $YSi_2 O_5$          | イッテルビウム | ホルミウム  | 緑色 |
| $YSi_3 O_7$          | イッテルビウム | ツリウム   | 青色 |

第 I 表に示した材料およびその変種の他にアルミネート、ホスフェートおよびバナデートも適する燐ホスト材料とすることができる。一般にホスト材料としてシリケートを使用する場合、変換効率は比較的低い。或る種の用途においては、ハイブリッドアップコンバート性燐結晶を作成することもできる（たとえば 1 種もしくはそれ以上のホスト材料および／または 1 種もしくはそれ以上の吸収剤イオンおよび／または 1 種もしくはそれ以上の発光剤イオンの組合せ）。

#### 無機燐ラベルの作成

無機燐を作成するための技術および方法は従来技術に記載されている。アップ

コンバート性燐結晶は各種の公開された方法で当業者により作成することができ

、限定はしないが次のものを包含する：ヨコム等（1971）、メタルルジカル・トランスアクションズ、第2巻、第763頁；カノ等（1972）、ジャーナル・エレクトロケミカル・ソサエティー、第1561頁；ウィトケ等（1972）、ジャーナル・アプライド・フィジクス、第43巻、第595頁；バン・ウイタート等（1969）、マテリアル・リサーチ・ブレチン、第4巻、第381頁（これらを参考のためここに引用する）。引用しうる他の刊行物は次の通りである：J. P. ジョワルトおよびG. メリー（1990）、ジャーナル・ルミネセンス、第46巻、第39頁；G. L. マックファーソンおよびS. L. マイエelson（1991）、ケミカル・フィジカル・レターズ（4月）、第325頁；オーメン等（1990）、ジャーナル・ルミネセンス、第46巻、第353頁；H. ニーおよびS. C. ランド（1991）、オブチックス・レターズ、第16巻（9月）；R. A. マックファーレン（1991）、オブチックス・レターズ、第16巻（9月）；コッホ等（1990）、アプライド・フィジカル・レターズ、第56巻、第1083頁；シルバースミス等（1989）、アプライド・フィジカル・レターズ、第51巻、第1977頁；W. レンスおよびR. M. マックファーレン（1990）、ジャーナル・ルミネセンス、第45巻、第346頁；ヒラオ等（1991）、ジャーナル・ノンクリスタリン・ソリッズ、第135巻、第90頁；マックファーレン等（1988）、アプライド・フィジカル・レターズ、第52巻、第1300頁（これらを参考のためここに引用する）。

一般に、無機燐粒子は慣用の当業界で知られた微粉碎法により所望の平均粒子寸法および分布まで微粉碎され、たとえば慣用のバレルミルにてジルコニアおよび／またはアルミナ球を用いて約48時間もしくはそれ以上の時間にわたり微粉碎する。結合分析に用いる燐粒子は典型的には直径約3.0～0.01  $\mu\text{m}$ （または非球状であれば長手軸線に沿った寸法）、より一般的には約2.0～0.1  $\mu\text{m}$ の寸法、より便利には約1.0～0.3  $\mu\text{m}$ の寸法であるが、これら寸法よりも大きい或いは小さい燐粒子も或る種の具体例には好適である。燐粒子寸法は、所望の特性に基づきここに説明した指針にしたがって実施者により選択される。特定の粒子寸法範囲を有するフラクションは一般に長時間（すなわち1日もし

くはそれ以上)にわたる沈降により作成することができ、適する沈降時間の後に所望寸法範囲のフラクションを取出す。沈降過程は、たとえばホリバ粒子アナライザを用いて監視することができる。

燐粒子は表面活性剤(たとえばエアロゾルOTのような陰イオン型表面活性剤)により微粉碎工程の際または微粉碎が完結した後に被覆もしくは処理することができる。たとえば、これら粒子は微粉碎に際しポリカルボン酸[たとえばアデーションXW 330、ヘキスト社、フランクフルト、ドイツ国またはタモール、ビベルロー等(1992)、上記参照]で被覆して、典型的には約pH6~8にて燐粒子の安定な水性懸濁液を作成することができる。燐粒子の水溶液のpHは、適する緩衝剤を添加すると共に所望のpH範囲まで酸もしくは塩基で滴定して調整することができる。コーティングの化学的性質に応じ、燐の変換効率における若干の低下も被覆の結果として生じうるが、レーザー励起源で用いる電力は変換効率におけるこの種の低下を補うると共に十分な燐発光を確保することができる。

一般に、無機燐粒子の作成および結合試薬への結合は実質的にベベルロー等(1992)(上記)およびタンケに係る米国特許第5,043,265号に記載されたように行われる。

しばしば、たとえばオキシスルフィドホスト材料を有する燐により、燐粒子は好ましくはたとえばアセトンもしくはDMSOなどの極性溶剤に分散されて、実質的に単分散のエマルジョン(たとえば保存溶液につき)を生成させる。単分散保存溶液の1部をさらに水溶液まで希釈することができる(たとえば緩衝水または緩衝塩水におけるアビジンの溶液)。

#### 結合分析

アップコンバート性燐およびアップコンバート性有機染料を、試料におけるアナライトの存在を検出および定量するための結合分析に使用すべく、レポータ(すなわち検出可能なマーカー)として使用することにより直接または間接的に結合試薬を標識する。結合試薬は、アップコンバート性レポータへの付着(たとえば表面吸着、共有結合)により直接に標識される。直接に標識しうる結合試薬は限定はしないが次のものを包含する:一次抗体(すなわち標的アナライトに結合



するもの)、二次抗体(すなわち一次抗体または補綴群、たとえばビオチンもしくはジゴシキシゲニンに結合するもの)、スタヒロコッカス・アウレウス蛋白A、ポリヌクレオチド、ストレプトアビジンおよびリセプタリガンド。さらに結合試薬は間接的に標識することもできる。すなわち一次抗体(たとえばウサギ抗-*erb-B*抗体)を、直接標識された二次抗体(たとえばアップコンバート性無機燐に結合したヤギ抗-ウサギ抗体)への非共有結合により間接的に標識することができる。アナライト-プローブ複合体の定量検出は、用いる各プローブに関する分析の適切な検量と組合せて行うことができる。プローブは便利には、たとえば励起照明のためのレーザー源または集中フォトダイオード源を用いて飽和励起条件下で検出される。

特定の結合分析は一般に均質分析および不均質分析に分類される。均質分析においては、結合標識プローブにより放出される信号は未結合標識プローブにより放出される信号とは異なり、したがって、これら2種を物理的分離工程の必要なしに識別することができる。不均質分析においては、結合および未結合の標識プローブから放出される信号は同一であるため、これら2種を識別するには物理的に分離せねばならない。古典的な不均質特定結合分析は放射性免疫分析(RIA)である[ヤロウ等(1978)、サイエンス、第200巻、第1245頁、参考のためここに引用する]。他の不均質結合分析は放射性リセプタ分析[クアトレカサス等(1974)、アニュアル・レビュー・バイオケミストリー、第43巻、第109頁]、サンドイッチ放射性免疫分析[米国特許第4,376,110号、参考のためここに引用する]、および抗体/レクチンサンドイッチ分析[EP 0 166 623号、参考のためここに引用する]を包含する。不均質分析が一般に好適であり、均質分析よりも一般に感度および信頼性が高い。

組織抽出物を作成する場合も生物液試料を使用する場合も、試料をその後の分析過程を実質的に阻害しない1種もしくはそれ以上の希釈剤で希釈することがしばしば望ましい。一般に、適する希釈剤は緩衝系(たとえば50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ もしくは5~100mM トリス、pH 4~10)、非干渉性イオン物質(5~500mM KClもしくはNaClまたは蔗糖)、および必要に応じたたとえばツイーンのような非イオン型洗剤を含有する水溶液である。分析すべき試料を

固体支持体に固定する場合は、一般にプローブと接触させる前に試料および固体支持体を希釈剤で洗浄することが望ましい。現物または希釈された試料を次いで診断アナライトにつき分析する。

本発明の一般的方法において、試料中のアナライトは、試料をアナライトに特異的もしくは優先的に結合して結合複合体を形成するプローブ-ラベル結合体と接触させ、次いで結合複合体の形成を典型的には結合複合体に存在するラベルの存在を測定して検出することにより、検出定量される。プローブ-ラベル結合体は直接標識アナライト-結合試薬（たとえばアップコンバート性燐に結合した一次抗体）および／または間接標識アナライト-結合試薬（たとえば標識第2抗体により検出される一次抗体、または標識ストレプトアビジンにより検出されるビオチニル化ポリヌクレオチド）を包含する。典型的には、結合複合体をラベルの検出前に一般に少なくとも1回の洗浄工程を行うことにより未結合プローブ-ラベル結合体から分離して、未結合プローブ-ラベル結合体に存在するラベルに起因するバックグラウンド信号を除去する。したがって、一般にプローブ-ラベル結合体をアナライト試料と共に結合条件下で適する結合時間にわたり培養することが望ましい。

結合条件はプローブ-ラベル結合体の種類、標的アナライトおよび特定分析法に応じて変化する。たとえば結合条件は一般に、プローブが現場でのハイブリッド化、ノーザンもしくはサウザンブロットまたは溶液ハイブリッド化分析で使用するポリヌクレオチドであるかどうかに応じて相違する。さらに結合条件は、プローブが現場での組織化学的染色法またはウエスタンブロットのいずれで用いられる抗体であるかに応じて相違する〔トウビン等（1979）、プロシーディング・ナショナル・アカデミー・サイエンスUSA、第76巻、第4350頁、参考のためここに引用する〕。一般に、結合条件は当業界で知られた一般的な結合法に応じて選択される。限定はしないが、たとえば次の結合条件が一般的指針として与えられる：

抗体プローブにつき：

10～200mM トリス、pH 6～8；一般に100mM トリス、pH 7.5  
15～250mM NaCl；一般に150mM NaCl

0.01～0.5、容量%ツイーン20

1%ウシ血清アルブミン

4～37℃；一般に4～15℃。

ポリヌクレオチドプローブにつき：

3～10×SSC、pH6～8；一般に5×SSC、pH7.5

0～50%脱イオン化ホルムアミド

1～10×デンハルト溶液

0～1%ドデシル硫酸ナトリウム

10～200 μg/ml 剪断された変性サケ精子DNA

20～65℃、一般に50bpより長いポリヌクレオチドプローブにつき37～45℃、一般に短いオリゴヌクレオチドプローブにつき55～65℃。

抗体およびポリヌクレオチドに関する結合条件の他の例は次の文献に示されている：マニアチス等、モレキュラ・クローニング：ラボラトリー・マニュアル（1989）、第2版、コールド・スプリング・ハーバー、N. Y.；並びにベルガーおよびキンメル、メソッズ・イン・エンチモロジー、第152巻、モレキュラ・クローニング技術の指針（1987）、アカデミック・プレス・インコーポレーション社、サンジエゴ、CA；ヤングおよびデービス（1983）、プロシエディング・ナショナル・アカデミー・サイエンスUSA、第80巻、第1194頁（参考のためここに引用する）。プローブがたとえばIL-2、β-インターフェロンまたは他のポリペプチドホルモン、サイトキンもしくはリンホキンのようなりセプターリガンドである場合、適する結合条件は一般に各りセプターリガンド結合分析を行うべく従来技術に記載された条件である。

免疫分析および免疫組織化学に有用な適する結合条件の種々の例がたとえばハロウおよびレイン、アンチボディース：ラボラトリー・マニュアル、コールド・スプリング・ハーバー、ニューヨーク（1988）（参考のためここに引用する）に検討されている。一般に、免疫学的反応の適する結合条件は塩（たとえば5～500mMNaClもしくはKCl）と緩衝剤（たとえばトリスもしくは磷酸塩緩衝剤、pH4～10）と必要に応じイオン型洗剤（たとえばツイーン）とを含有する水性結合緩衝剤を包含する。或る種の具体例においては、プロテナーゼ

抑制剤もしくは安定剤も含ませることができる。結合反応は抗体反応については典型的には少なくとも約1～5分間、好ましくは少なくとも約30分間～数時間である適する結合時間にわたり行われるが、典型的には約24時間未満、より好ましくは約数時間以下である。結合反応（洗浄を含む）は典型的には約0～約45℃、好ましくは約4～約20～25℃の温度範囲で行われる。

その場でのハイブリッド化、その場での結合分析、および免疫組織学的染色を包含する結合分析は一般に、先ず最初に試料を封鎖用または予備ハイブリッド化用の溶液と共に培養し、次いで試料を結合条件でプローブと共に適する結合時間にわたり培養し、次いで未結合のプローブを洗浄または他の方法で除去し、最後に結合プローブの存在、量および／または位置を検出することにより行われる。結合プローブを検出する工程は、プローブが直接標識される場合はラベルを検出することにより、或いは結合複合体を標識されてプローブに結合する二次結合試薬（たとえばストレプトアビジン）と共に培養してプローブを間接的に標識することにより行うことができる。

アップコンバート性ラベルはプローブまたはプローブに特異的もしくは優先的に結合する第2結合試薬に、ここで説明する各種の方法により付着される。さらに、アップコンバート性燐粒子は微小球に包封してプローブ（たとえば特異性抗原もしくは抗体）で免疫診断分析または核酸ハイブリッド化分析における標識プローブとして使用すべく被覆し、試料におけるアナライト、たとえば血清試料における抗体、ウィルスもしくは抗原の存在をハリー等（1990）、バイオテクニクス、第9巻、第342頁参考のためここに引用する）の方法により検出する。燐のマイクロカプセル化は当業界で知られた数種の方法で行うことができ、たとえばモノマー溶液による燐の被覆および燐粒子を包封するポリマーシェルを生成させるためのモノマーの重合を包含する。ポリマー被覆（たとえばゲル被覆）に埋込まれた燐粒子を官能化して（たとえばアミノ基により）、結合成分に共有付着させることができる。

同様に、アップコンバート性燐粒子は表面吸着、多重水素結合、静電気相互作用、ファンデルワールス結合または官能化無機燐粒子（たとえばガラスセラミック燐）上への官能基の共有結合により、たとえばプローブ蛋白のアミノ酸側鎖ア

ミンもしくはカルボキシレート基をそれぞれ官能化燐粒子におけるカルボキシレート基もしくはアミン基に結合させることにより直接にプローブで被覆することができる。

たとえば嵩高アップコンバート性燐粒子の立体的および／または帯電干渉が標的に対する結合試薬の結合を阻止するような或る種の具体例においては、分子スペーサを燐粒子と結合試薬との間に組込むことが望ましい。たとえば誘導化されたマイクロカプセル化燐またはガラスセラミック燐を、 $-(CH_2)_n-$ スペーサ（ここで  $n$  は一般に約 2 ～ 約 50 の整数である）を有するヘテロニ官能性試薬に末端官能基間で結合させることができる。同様に、燐は長い分子内スペーサ連鎖を有する誘導化用試薬（たとえば  $\omega$ -官能化シラン）で直接に誘導化することができ、所望の結合試薬に対し反応性の官能基は一般に少なくとも約 15 オングストロームのスペーサ（すなわち約 10 個の  $-CH_2-$  直鎖基に等しい）により燐の表面から分離される。或る種の具体例において、ラベルを種々の長さのスペーサアームにより付着させて有力な立体障害を減少させる。スペーサアームの複数層も用いることができる（たとえば複数層のストレプトアビジン-ビオチン結合）。

#### 多重アナライト検出

アップコンバート性燐は励起および／または発光波長スペクトルに基づいて区別しうるので、たとえば細胞表面抗原もしくは可溶性巨大分子のような複数アナライト標的を検出および識別するためアップコンバート性燐を使用することができる。

たとえばストレプトアビジン、アビジンまたは他のリンカー巨大分子（たとえば抗ジゴキシゲニン抗体）をそれぞれ吸収および／または発光スペクトルにて相違する 2 種の異なる燐（例示のため、ここでは燐 No. 1 および燐 No. 2 と称する）のそれぞれに付着させて、吸収および／または発光波長に基づく 2 種の燐の識別を容易化させる。たとえば一方の燐は青色で発光しうるのに対し、他方は緑色にて発光することができる。限定はしないが、たとえば  $Na(Y_{0.08}Yb_{0.18}Er_{0.02})F_4$  は主として緑色で発光するのに対し、 $Na(Y_{0.73}Yb_{0.27}Tm_{0.001})F_4$  は主として青色にて発光し、したがってこれら 2 種の燐はその燐光

性発光に基づき識別することができる。或いは2種の燐は実質的に同様な発光スペクトルを発生しうるが、異なる励起波長を有して多重アナライト検出における識別の基礎を与えることができる。第1アナライト物質（たとえばリンパ球CD4抗原）に特異的に結合すると共にストレプトアビジン-燐No. 1結合体により結合しうるビオチニル部分を有する第1結合成分（たとえば抗体）を使用して、試料（たとえば血清試料）における第1アナライトの存在をアナライト-結合成分複合体における燐No. 1の燐光の測定により定量検出することができる。第2アナライト物質（たとえばHIV-1配列）に特異的に結合すると共に抗ジゴキシゲニン-燐No. 2結合体により結合しうるジゴキシゲイン部分（たとえば11-UTP-ジゴキシゲニン）を有する第2結合成分（たとえばプローブポリヌクレオチド）を用いて、試料における第2アナライトの存在をアナライト-結合成分複合体における燐No. 2の燐光の測定により定量検出することができる。かくして、分化しうる信号特性を有する複数燐レポータの存在を同時的に検出することにより、複数アナライトを単一試料で定量検出することができる。

#### サンドイッチ結合分析

アップコンバート性燐ラベルをサンドイッチ結合分析用のレポータとして使用することができる〔米国特許第4, 376, 110号（参考のためここに引用する）〕。たとえば超常磁性の免疫ビーズまたは官能化磁気化しうるポリマー粒子（ポリサイエンス・インコーポレーション社、ワーリントン、ペンシルバニア州）のような磁性ビーズを固体基質として使用することができ、これはアナライトの第1エピトープ（すなわち結合部位：抗原決定子、糖部分、化学置換基もしくはヌクレオチド配列）に結合する固定化された第1結合成分（たとえば抗体、ポリヌクレオチドもしくはレクチン）を有する。アナライトは第1結合成分に結合し、さらにアナライトの第2エピトープに結合する第2結合成分（たとえば抗体、レクチンもしくはポリヌクレオチド）にも結合する。したがって、アナライトはこれら2種の結合成分を架橋してサンドイッチ複合体を形成し、これを固体基質に対し固定化させる。第2結合成分は典型的には付着した或いは組込まれたラベル（たとえばビオチニル基のようなラベル）を有し、このラベルはストレプトアビジン被覆されたアップコンバート性燐に結合することができる。或いは、

第2結合成分はたとえば官能化されたガラスラセミック質アップコンバート性燐との共有結合を介しアップコンバート性燐に直接結合することもできる。

サンドイッチ複合体は第1結合成分とアナライトと第2結合成分とからなり、直接に或いは間接的にアップコンバート性レポータで標識される。かくしてサンドイッチ複合体は固体基質に固定化されるが、固体基質自身は移動性である（たとえば超常磁性ビーズは試料スラリーにて循環する）。アナライト存在および量は、サンドイッチ複合体におけるアップコンバート性レポータの存在を検出して定量測定することができる。

たとえば固定基質は複数の異なる種類の第1結合成分（たとえば固定支持体に固定された複数の異なるオリゴペプチド）を有することができる。1種もしくはそれ以上の第1結合成分は、固定支持体と接触するアナライト溶液における特定アナライト（たとえばムスカリンリセプタ）に結合することができる。1種もしくはそれ以上の第1結合成分に対するアナライトの結合は、アップコンバート性燐により標識された（直接的に或いはビオチニル化された二次抗体を介し）第2結合成分（たとえば抗ムスカリンリセプタ抗体）で検出することができる。

固定基質は第1結合成分に付着して2種以上の異なるアナライト（たとえば免疫交差反応性もしくはポリ特異性とすることができる）に結合することができ或いは複数の第1結合成分に付着して複数の異なるアナライトに結合することができる。同様に、特定のアナライトに対する結合特異性を有する複数の第2結合成分を用いることもできる。複数の第2結合成分を用いる場合、典型的には吸収および／または発光特性に基づいて識別しうる独特なアップコンバート性ラベルにより各第2結合成分を標識することが望ましい。

種々異なる吸収剤を各種の放出剤と組合せて用いることにより励起および発光スペクトルの数種の区別可能な組合せを有する燐のコレクションを得ることができる。たとえば限定はしないが、6種の区別しうる燐を2種の吸収剤および3種の発光剤から発生させることができる。第1の吸収剤 $A_1$ は $\lambda_{A1}$ の励起波長を有し、第2の吸収剤 $A_2$ は $\lambda_{A2}$ の励起波長を有し、第1の発光剤 $E_1$ は $\lambda_{E1}$ における発光ラインを有し、第2の発光剤 $E_2$ は $\lambda_{E2}$ に発光ラインを有し、第3の発光剤 $E_3$ は $\lambda_{E3}$ に発光ラインを有する。6種の燐を区別して、それぞれからの信号

を個々に試料を励起波長 $\lambda_{A1}$ で照明すると共に別々に $\lambda_{E1}$ 、 $\lambda_{E2}$ および $\lambda_{E3}$ における発光照射線を検出し、さらに試料を $\lambda_{A2}$ で照明すると共に別々に $\lambda_{E1}$ 、 $\lambda_{E2}$ および $\lambda_{E3}$ における発光照射線を検出して定量することができる。第I I表は種々の吸収剤：発光剤の組合せ物、並びにその励起および発光波長を示す。

第 I I 表

| 吸収剤：発光剤の組合せ | 励起 $\lambda$   | 発光 $\lambda$   |
|-------------|----------------|----------------|
| A 1 : E 1   | $\lambda_{A1}$ | $\lambda_{E1}$ |
| A 1 : E 2   | $\lambda_{A1}$ | $\lambda_{E2}$ |
| A 1 : E 3   | $\lambda_{A1}$ | $\lambda_{E3}$ |
| A 2 : E 1   | $\lambda_{A2}$ | $\lambda_{E1}$ |
| A 2 : E 2   | $\lambda_{A2}$ | $\lambda_{E2}$ |
| A 2 : E 3   | $\lambda_{A2}$ | $\lambda_{E3}$ |

勿論、6種より多い区別しうる燐ラベルを得るには、追加の吸収剤：発光剤組合せを用いることもできる。

さらに識別しうる（たとえば寸法、色、密度、磁気特性、形状、電荷により）異なる種類の固体基質を用いて、特定種類の固体基質を特定種類の第1結合成分と関連させることもできる。

限定はしないが、たとえば次の3種の簡単な実施例を示して多重アナライトサンドイッチ分析法の可能な用途につき説明する。

### 基質分別化

次の実施例は、識別可能な基質種類を用いて患者の免疫状態（たとえば特定抗原に対する患者の血清反応）に関する診断情報を与えうる試料（たとえば患者から採取された血清試料）における特定の免疫グロブリン遺伝子型の存在を検出する例につき説明する。

大きい超常磁性ビーズを免疫原性ヘルペスウィルス型11エンベロプグリコ蛋白に結合させ、中庸寸法の超常磁性ビーズをHIV gp120グリコ蛋白に結合させ、小さい超常磁性ビーズを免疫原性サイトメガロウィルスエンベロプグリコ蛋白に結合させる。血清試料を患者から採取し、試料における免疫グロブリン



と3種の固定化されたウィルスグリコ蛋白とを特異的に結合させうる結合条件下で超常磁性ビーズの混合物と共に培養する。これら超常磁性ビーズを試料から分離して非特異的に結合した免疫グロブリンを除去すると共に、結合条件下でIgGに結合するスタフィロコッカス・アウレス蛋白Aで被覆されたアップコンバート性燐と共に培養する。次いで、特異的に結合したIgGを有する超常磁性ビーズを燐-蛋白A結合体で標識する。大型、中形および小型の超常磁性ビーズを次いで別々に燐励起電磁線で照射し、時間ゲートの発光した燐光を検出する。必要に応じ非特異的結合に基づくバックグラウンドを内部標準ビーズ（超常磁性ビーズで被覆された牛血清アルブミン）並びに陽性および陰性比較血清試料を用いて決定する。大型、中形および小型ビーズに関連する燐光の強度は、ヘルペスウィルスII型エンベロプグリコ蛋白、HIV gp120グリコ蛋白およびサイトメガロウィルスエンベロプグリコ蛋白に対しそれぞれ反応性である試料における抗体の量の尺度を与える。この情報を用いて、個々の患者がHIV-1、ヒトCMVおよび／または単純疱疹11型ウィルスで感染されているかどうかを決定することができる。

### 燐分別化

次の実施例は、分別化しうるアップコンバート性燐を用いて血清もしくは脳生検試料における特定種類のヒトAPP（アミロイド先駆体蛋白）の存在および相対的量を検出する例につき説明する。各種のAPPが、異なるエキソン使用および／または異なる蛋白分解処理過程の結果として脳で生ずる。たとえば全ゆる種類のAPPは共通の仮定のエピトープ（X）を有しうるが、特定種類のAPPは独特のエピトープ（Y）を有すると共に、他の種類のAPPは独特のエピトープ（Z）を有することができる。試料における特定のAPP種類の相対量は予測値とすることができ、或いはアルツハイマー氏病の発病源とすることもできる。

超常磁性ビーズを、全種類が有する共通のAPPエピトープ（X）に特異的に結合する抗体に結合させる。独特のYエピトープに対し反応性の特異的抗体を、波長 $\lambda_1$ により励起されて青色に集中する波長スペクトルで発光する燐No. 1で標識する。独特のZエピトープに対し反応性の特異的抗体を、波長 $\lambda_2$ により励起されて緑色に集中する波長スペクトルで発光する燐No. 2で標識する。こ

れら A P P 種類を含有する試料を超常磁性ビーズおよび標識された特異的抗体と共に結合条件下で培養する。超常磁性ビーズを試料から個々に或いはバルクで取出す。これらビーズの波長  $\lambda_1$  で照明して青色発光を検出すると共に測定し、さらに  $\lambda_2$  で照明して緑色発光を検出すると共に測定する。 $\lambda_1$  誘起の青色発光の強度は Y エピトープを有する A P P 種類の尺度である一方、 $\lambda_2$  誘起の緑色発光の強度は Z エピトープを有する A P P 種類の尺度である。2 種の燐からの発光が容易に識別できれば、 $\lambda_1$  および  $\lambda_2$  は同一とすることができる。2 種の燐の基準化した相対強度は Y エピトープもしくは Z エピトープを含有する A P P 種類の相対量の尺度を与える。

#### 燐および基質の分別化

次の実施例は、個人から採取した血液試料における特定 T リンパ球サブ群の存在および相対量を検出するための識別可能な基質種類と組合せた区別しうるアップコンバート性燐の使用につき説明する。T 細胞サブ群の検出に関しここに説明するが、アナライト多重化（すなわち各種の固体基質および／またはアップコンバート性燐ラベルを用いる試料における複数アナライトの検出および／または特性化）も一般的に用いるうる方法であると思われる。

大きい超常磁性ビーズを抗-CD 4 抗体に結合させ、中庸寸法の超常磁性ビーズを抗-CD 8 抗体に結合させ、小さい超常磁性ビーズを抗-CD 2 8 抗体に結合させる。CD 2 抗原に特異的に結合する抗体を、励起波長  $\lambda_1$  を有すると共に赤色で発光するアップコンバート性燐で標識する。CD 4 5 R 抗原に特異的に結合する抗体を、励起波長  $\lambda_2$  を有すると共に緑色で発光するアップコンバート性燐で標識する。CD W 6 0 抗原に特異的に結合する抗体を、励起波長  $\lambda_3$  を有すると共に青色で発光するアップコンバート性燐で標識する。

血液（または血清、唾液、尿、糞、生検組織など）試料を患者から採取し、超常磁性ビーズと燐標識抗体との混合物と共に、3 種のビーズ固定化された抗体および 3 種の燐標識された抗体との血液試料における細胞の特異的結合を可能にする結合条件下で培養する。抗原-抗体結合が生じた後、超常磁性ビーズを分離して順次に或いは同時に  $\lambda_1$ 、 $\lambda_2$  および  $\lambda_3$  での照明および赤色、緑色および青色の発光の定量検出によりそれぞれ検査する。たとえば大型ビーズに関連する  $\lambda$

1. 誘起の赤色発光の強度は、CD4およびCD2表面抗原を有する細胞の量および／またはこれら表面抗原の相対量の凡の尺度である（たとえばCD2を有する極めて少ないCD4<sup>+</sup>細胞も存在するが、これら僅かな細胞は多量のCD2抗原を有し、したがって大きいCD2燐光信号を有する）。同様に、大型ビーズに関連するλ<sub>2</sub>誘起の緑色光の強度は、CD4およびCD45R表面抗原の両者を有する細胞の量および／または試料におけるこれら表面抗原の相対量の凡の尺度である。

このようにして、たとえば血液試料のようなアナライト試料を、各種のアナライト物質の存在および相対的分布（たとえば同時分離および／または相関関係）につき「特性化（fingerprint）」することができる。この種のアナライト指紋を用いて診断もしくは治療情報を与えることができ、たとえば患者の免疫状態を測定し或いは特定の血球に向けられた化学療法の反応を測定することができる。同様なアナライト指紋を用いて、病原生物およびウィルスを分類すると共にポリヌクレオチド配列を遺伝子地図化および／または配列決定のため用いることができる。

寸法、形状、色または密度に基づき区別しうる超常磁性ビーズを個々に磁氣的に捕えて、適する励起照明で走査すると共に特定アナライトに特徴的な燐放光を検出することができる。たとえば単一検出器は同時的に超常磁性ビーズを懸濁物から捕らえると共にビーズ種類（寸法、形状および／または色）を決定し、特定燐の存在および量につき走査することができる（励起波長での照明および発光波長での検出による）。

平均して1個もしくはそれ以下のアナライト（たとえばリンパ球）がマイクロビーズ1個当りに結合する希釈条件下での結合分析を行うことにより、個々に細胞を分類し（たとえば個々の各CD4<sup>+</sup>細胞におけるCD45Rの量を決定し）、かくして一層正確なリンパ球サブ群を規定することができる。

さらに、ビオチニル化された磁性ビーズを用いて燐粒子に対するストレプトアビジンの結合速度を監視し、或いはストレプトアビジン被覆されたアップコンバート性燐粒子を反応から分離または精製することもできる。すなわち、ストレプトアビジンとアップコンバート性燐粒子とを、反応容器内でストレプトアビジン

被覆燐粒子を形成する結合条件下で混合する。適する結合時間の後、未結合のストレプトアビジンを除去し（たとえば燐粒子をペレットとして集め、上澄液における未結合のストレプトアビジンをデカントし、ペレットを再懸濁させる遠心分離による）、ビオチニル化された磁性ビーズを残余の燐懸濁物に結合条件下で添加し、ストレプトアビジン被覆燐粒子をビオチニル化磁性ビーズに結合させて回収する。

#### アップコンバート性燐による光物理的触媒作用

本発明の他の用途はプローブに結合した光物理的触媒として燐を用い、燐により発光された照射線を典型的には染料分子と共に用いて検出以外の種々の目的（たとえば細胞毒性、化学物質のイオン化、突然変異など）につきプローブに隣接した領域に強力な局在電磁線を発生させる。たとえば $CD8^+$ リンパ球における $CD8$ 抗原のような細胞表面抗原に特異的に結合する抗体をアップコンバート性燐に結合したプローブとして使用し、 $CD8^+$ リンパ球に対し燐を局在させることができる。 $CD8^+$ リンパ球を含有する試料を抗- $CD8^+$ プローブ-燐結合体と共に培養し、励起波長（たとえば赤外レーザーダイオードから）を照射して抗- $CD8^+$ プローブ-燐結合体が結合した $CD8^+$ リンパ球の近傍にアップシフト光子（すなわち、より高い周波数の電磁線）を放出させる。放出された照射線は直接的な突然変異性および／または細胞毒性である波長（たとえばチミン二量体の形成をもたらす紫外線、 $760\sim 765\text{ nm}$ の光は染色体損傷をもたらすと思われる）とすることができ、或いは環境中に存在する化学物質の光分解をもたらして隣接する細胞を損傷しうる反応性物質の局部的形成をもたらしうる波長とすることができ（たとえば、ブックミンスターフルレン（buckminsterfullerene）の光分解（ $C_{60}$  から  $C_{58}$  および  $C_2$  への分解）は細胞膜のリピド過酸化をもたらしうる遊離基を発生しうる）。

燐-発光照射線は等方性であるため、一般に標的（たとえば $CD8^+$ リンパ球）を非標的（たとえば $CD8^-$ リンパ球）から励起照射の前に物理的に分離して等方性発光による非標的に対する望ましくない損傷（すなわち「二次的損傷」）を回避することが望ましい。物理的分離は限定はしないが次のことを包含する各種の手段により行うことができる：（1）標的および非標的細胞の希釈懸濁物に

対し励起照射を行い、個々の細胞を分離する平均間隔を充分にして、非標的に対する二次的損傷を減少させる手段、および(2)流体力学的集中を用いて細胞(標的および非標的の両者)を照明帯域に(たとえば蛍光活性化細胞ソータなど)に1回通過させる手段。たとえば抗- $CD8^+$ 抗体に結合したアップコンバート性燐を用いて、リンパ球試料における $CD8^+$ リンパ球を選択的に損傷させることができ、ここで(1)燐は直接的に細胞毒性である波長にて発光し、かつ/または(2)燐は試料中に存在する化合物の光触媒作用により反応性化学物質を生成する波長で発光する(たとえば、試料をバックミンステルフレレンでドープすることができる)。

発光照射線を組織もしくは腫瘍に対する光触媒作用につき直接使用する代りに、励起型の酸素(いわゆるシングレット励起酸素( $O_2^1\Delta g$ ))を染料感作剤から溶解分子酸素へのエネルギー移行によって発生させることができる。この方式は、無機アップコンバート性燐に達する近赤外線(赤色光および紫外光、970nmを含む)の組織浸透力を利用する。赤外光子の2個が赤色、緑色もしくは青色光子のいずれかに、感作剤染料の吸収スペクトルに応じて変化する。この染料をアップコンバート性照射線によりトリプレット状態まで励起させて、そのエネルギーを溶解酸素分子に移行させることにより励起(シングレット)酸素分子を生ぜしめる。シングレット酸素の細胞毒性活性については光力学療法および他の生物医療用途に充分説明されている[ワグニエレス等、1990年1月19~21日、「光力学療法の将来の指針および用途、第249頁;光学的装置工学の高度光学技術協会のSPIEインスティテュート、私書箱10、ベリンガム、ワシントン98277;ペレグリン等(1991)、キャンサー、第67巻、第2529頁;ワグニエレス等、1991年5月24~25日、「光力学療法の将来の指針および用途」、第219頁;ホリー等(1991年12月17日)、フルオレスセイン・クリニック、第4頁;ブライコッテ等(1991年5月)、ENT-クリニック、ローザンヌ、スイス国、参照]。

この用途においては、アップコンバート性燐をたとえばメチレンブルー、ローズベンガルもしくはフタロシアニン誘導体(たとえばZn-フタロシアニン)のような感作性染料と混合し或いは組合せる。第1および第3の場合は赤色発光性

燐を用いるのに対し、ローズベンガルについては緑色発光性燐が特に適している。フタロシアニン誘導体がこの目的に理想的である。何故なら、水溶液もしくは生物学的溶液に全く不溶性であるからである。したがって、これら染料は発光剤の直ぐ近傍に留まって、細胞表面—レポータ／プローブ／染料複合体の特異性が制限因子になる。この場合、好ましくは0.1～0.3  $\mu\text{m}$ の寸法範囲におけるレポータ／プローブ／染料組成物の特定組合せ物を合成して、効率的なエネルギー移行を可能にせねばならない：先ず最初に、アップコンバート照射線をできるだけ完全に染料により吸収させる。第2に、染料励起エネルギー（トリプレット状態）を溶解分子酸素に移行させる。これら両過程は、感作剤染料の吸収スペクトルがアップコンバート照射線に適合すれば極めて効率的である。

この方式は、赤色光を追跡および診断の両者に使用しうると共にアップコンバートの後に治療目的にも使用しうる点で従来の光力学療法よりも優れた手段を与え、したがって約1000 nmにおける1個のみの（赤外）光源しか必要としない。他の利点は、他の公知の光力学療法の励起方式（750～850 nm）と対比し、生物学的試料における赤外照射線の大きい範囲である。

光物理的触媒としてアップコンバート性燐を用いる具体例につき、一般に次のことが望ましい：（1）励起照射線の波長は基質化合物の顕著な光触媒作用を与えないこと、（2）励起照射線の波長は直接的に細胞毒性もしくは突然変異性でないこと並びに（3）発光照射線は直接的に細胞毒性でなく或いは生物学上有効量の基質化合物（たとえばバックミンステルフレレン、プソラレン、アジド置換基もしくは他の光活性基を有する化合物）を発生するのに適する波長を有すること。或いは、ポリペプチドのヒスチジン側鎖を染料感作剤（たとえばメチレンブルーもしくはローズベンガル）の存在下に光により酸化させることもできる「蛋白、構造および分子原則（1984）、クレイトン（編）、W. H. フリーマン・アンド・カンパニー社、ニューヨーク；「蛋白構造の序論」（1991）、C. ブランデンおよびJ. ツーゼ、ガーランド・パブリッシング社、ニューヨーク、NY、参考のためここに引用する」。たとえば、抗-CD8抗体に結合したアップコンバート性燐を光物理的触媒として使用することにより、CD8型<sup>+</sup>リンパ球に対し選択的かつ局在した損傷を生ぜしめることができる。本発明によれば

、  
 実質的に任意の抗体を適するアップコンバート性燐に直接的に或いは蛋白Aに対する結合により結合させ、次いで免疫グロブリンに結合させることができる。たとえば本発明によるアップコンバート性の光物理的触媒を用いて実質的に任意所望の抗原または細胞種類を標的とし、同定された抗原の存在により識別することができる。

### アップコンバート性有機染料

アップコンバート性無機燐レポータと同様に、蛍光が光電子手段により検出されるような「分子」ラベルを使用することも提案される。赤外光もしくは赤色光は標的に結合したプローブレポータ複合体を励起させ、その後に光を照明源に比べ短い波長にて発光させる。このアップコンバートした光は光源からの分散光を含まず、或いはその高エネルギーにより自己蛍光を示さない。さらに、自己蛍光は赤外もしくは赤色スペクトル範囲における励起により著しく減少する。光源はポンプパルスが短いポンプレーザーであって、高出力および低エネルギーを得ることにより染料における非直線的光学過程を可能にする。その目的は、染料における第2励起シングレット状態 ( $S_2$ ) を2個の赤色もしくは赤外フォトンにより調整可能な染料レーザからの p s パルスで励起させることである。 $S_2$  状態をポンピングした後、染料は数 p s 内で蛍光性状態 ( $S_1$ ) まで弛緩して、光電子手段により検出することができる。2個のフォトンを用いて  $S_2$  状態に到達する目標は、2-フォトン断面を増加させる利点を利用し埋める点にある。何故なら、2-フォトン吸収を用いて  $S_0$  状態に達するからである。非共鳴2-フォトン吸収断面は  $10^{-49} \sim 10^{-50} \text{ cm}^4/\text{s}$  の程度あるのに対し、 $S_2$  吸収に対応する断面はその2～3倍程度大である。幾つかの特定例を挙げれば次の通りである：一般にシアニン、キサンテン、ローダミン、アクリジンおよびオキサジンがこの目的に極めて適している。さらに青色染料も使用しうるが、励起波長は赤色である。ローダミンは2個のフォトンを用いて  $650 \sim 700 \text{ nm}$  にて励起させることができ、蛍光は約  $555 \text{ nm}$  であると予想される。たとえば IR-140、IR-132 および IR-125 のような多くの IR 染料は Nd:YAG に基づく

2個の光子を用いて1060 nmで励起することができ、蛍光は850～950 nm範囲にあると予想される。青色染料の例は480 nmで励起される

B B Qであって240 nmでS。状態に達し、蛍光は390 nmにあると予想される。これら染料の多くは水溶液に対し極く僅かに可溶性であって極性を有し（シアニン）、或いは極性置換基を有する。プローブの性質に応じ、全く或いは殆ど付着化学を行う必要がない。何故なら、染料発色団には官能基が多いからである。数会社が全ゆる種類の染料を販売している：その例はコダック社、エクサイトン社およびラムダ・フィジック社である。有機染料分子における2-光子レーザー励起の科学的基礎が幾つかの実験論文で処理されている：A. ペンズコフアーおよびW. ロイパッハー、*Optical and Quantum Electronics*, 第19巻（1987）、第327～349頁；C. H. チェンおよびM. P. マックキャン、*Optics Communications*, 第63巻（1987）、第335頁；J. P. ハーマンおよびJ. ズクーイング、*Optics Communications*, 第6巻（1972）、第101頁；B. フーコールトおよびJ. P. ハーマン、*Optics Communications*, 第15巻（1975）、第412頁；リー・シチュンおよびC. Y. シー、*Optica Acta*, 第29巻（1982）、第281～287頁；D. J. ブラッドレー、M. H. R. ハッチンソンおよびH. ケーツァー、*Proc. R. Soc. Lond. A*, 第329巻（1972）、第105～119頁。

#### 共鳴多重光子イオン化

極めて高いレーザー強度でアップコンバート性有機染料を誘起させて、集中したレーザー照射線のフィールドにてさらに励起光子を吸収させる。これら高いレーザー強度にて、蛍光は追加光子の吸収に有利となるよう抑制される。この過程は一般に有機染料分子を溶液におけるイオン化限界より高くし、電子を溶剤シェル中に放出して安定化する。この3-光子相互作用の結果は分子イオンおよび付着もしくは溶媒和電子となる。この荷電分離が電場で生ずる際、電荷が移動すると共に電圧を発生し、これを極めて鋭敏に検出することができる。これは溶剤系における一時的導電率の測定値となり、一般に光検出よりも鋭敏であ



る。この方法の欠点は、移動する電荷を検知する電極を必要とすることである。その意味で光検出と同様な非浸蝕的方法でない。他方、これは極めて有利である光電気信号への光の変換を迂回する。全ての光学系は効率を低下させる制限され

た視野角度を有するのに対し、光イオン化は発生した電荷の100%近くを常に「検知」する。効果的に、レーザーフィールドの非線状相互作用は全ての励起有機染料分子を充分高いフィールド強度にて充分に電気パルスに変換し、これら強度は市販レーザー源を用いて日常的に達成することができる。その特定例は約650~700 nmのローダミンの励起、または約480 nmのBBQ励起である。赤色にて吸収する有機染料はS<sub>2</sub>まで励起された後に2個の追加フォトンを吸収し、したがって全過程を4-フォトン励起過程にし、これは3-フォトン非線状工程よりも遅い。しかしながら、この種の4-フォトン過程が望ましい場合も存在する。

#### 検出装置

無機アップコンバート性燐の検出および定量は一般に次の操作によって行われる：(1) アップコンバート性燐を含有すると思われる試料に励起波長の電磁線を照射し、さらに(2) 燐光放射線を1つもしくはそれ以上の発光波長バンドで検出する。

試料の照明は、試料を少なくとも1個の励起源により発生した電磁線に露出して行われる。各種の励起源、たとえば赤外レーザーダイオードおよび白熱フィラメント並びに他の適する発生源を用いることができる。励起波長範囲にて高い透過性および1つもしくはそれ以上の望ましくない波長バンドにて低い透過性を有する光学フィルタを用いて、望ましくない波長を光源照明から除去することができる。望ましくない波長範囲は一般に、検出可能な試料の自己蛍光を発生するか或いは励起最大波長の約25~100 nm内にあつて散乱励起照明からのバックグラウンドノイズの有力な発生源となる波長を包含する。励起照明はさらに多重化し或いは視準することもできる。たとえば複数コヒーレント発生源(たとえばレーザー)からの種々の周波数を有するビームを視準すると共に一連の2色ミラーを用いて多重化することができる。このようにして、異なる励起波長バンドを有

する複数の燐物質を含有した試料をその励起周波数にて同時に照明することができる。照明は連続的またはパルスとすることができ、或いは連続波（CW）およびパルス照明を組合せて複数照明ビームを多重化し（たとえばパルスビームをCWビームと多重化し）、CW源により誘起された燐光とパルス源により誘起され

た燐光との間の信号識別を可能にし、同様な発光スペクトルを有するが異なる励起スペクトルを有する複数燐物質を識別することができる。限定はしないが、たとえば市販入手しうる砒素化ガリウムレーザーダイオードを近赤外光を与えるための照明源として使用することができる。

アップコンバート性燐を刺激するため赤外励起を使用しうる可能性は幾つかの利点を与える。第1に、安価なIRおよび近IRダイオードレーザーを、特に水により吸収されないIR波長バンドにて、維持された高強度励起照明につき使用することができる。高強度照明のこのレベルは、たとえば通常の蛍光染料（たとえばFITC）のような慣用のラベルと共に使用するには適さない。何故なら、高強度UVもしくは可視光線はラベルの強力な光漂白をもたらし、試料を強力に損傷するからである。光漂白または試料損傷なしに高照明強度を用いる可能性はより大きい有力な信号をもたらし、したがってより感度の高い分析を可能にする。

照明源としてのダイオードレーザーの使用に対するアップコンバート性ラベルの適合性は、ランプ発生源および他の大抵のレーザー源よりも明確な他の利点を与える。第1に、ダイオードレーザー強度は駆動電流の変調により直接に変調することができる。これは、時間ゲートもしくは位相敏感検波の技術に関する光の変調を可能にして、追加変調器を用いることなく感度向上を与える。変調器は高電圧回路と高価な結晶とを必要とし、コストおよび装置寸法の増大をもたらす。レーザーダイオードまたは発光ダイオードは直流変調により脈動にすることができる。第2に、レーザー照明源は全く単色である照明を与えると共に、極めて小さいスポット寸法に密に集中させることができ、信号とノイズとの比および感度における利点を所望の励起スペクトル領域および照明量の範囲外における減少したバックグラウンド光に基づいて与える。ダイオードレーザーは、他の慣用レーザ

一源の追加経費および寸法を伴わずに顕著な利点を与える。

励起アップコンバート性燐からの燐光照射線の検出および定量は、各種の手段により行うことができる。燐光発光を検出する種々の手段を用いることができ、限定はしないが次のものを包含する：光電子増倍管デバイス、電子なだれフォトダイオード、電荷結合素子（CCD）、CIDデバイス、写真フィルム乳液、検

出可能な生成物をもたらす光化学反応、並びに肉眼観察（たとえば蛍光顕微鏡）。レポータが有機染料であれば、静電位置感受性検出器を用いて共鳴マルチフォトンイオン化を検知することができる。検出は時間ゲートおよび／または周波数ゲートの光収集を用いて残留バックグラウンドノイズを排除することができる。時間ゲート検出が一般に望ましい。何故なら、これは照明を終了した後に長時間発光の記録方法を与えるからである。したがって、アップコンバート性燐の燐光または遅延蛍光に起因する信号を記録すると共に、存在する場合には短寿命の自己蛍光および散乱照明光が排除される。時間ゲート検出は、回転羽根（すなわち機械的チョッパ）での特定の時間的機械封鎖により或いは電子手段により行うことができ、即発信号（すなわち照明を終了してから約0.1～0.3  $\mu$ s以内で生ずる）が排除される（たとえば電子制御の固相光学シャッタ、たとえばポッケルもしくはケールセル）。アップコンバート性燐およびアップコンバート性遅延蛍光染料は典型的には約数ミリ秒（恐らく10 ms程度であるが、典型的には1 msの程度）の発光寿命を有するのに対し、バックグラウンドノイズは一般に約100 ns以内で減衰する。したがって、パルス励起源を用いる場合、一般に時間ゲート検出を用いて即発信号を排除することか望ましい。

アップコンバート性燐は光漂白を受けないので、極めて弱い放出燐信号を集めると共に極めて長い検出時間（連続照明または多重パルス照明）にわたり積算して検出感度を増大させることができる。この種の時間積算は電子的または化学的（たとえば写真フィルム）とすることができる。非赤外写真フィルムを弱い放出信号を検出するための手段として使用する場合、アップコンバート性レポータはダエンコンバー性（down-converting）燐と比較して励起源が典型的にはフィルムの顕著な露出を生ぜしめない（すなわち暗室の安全光と同様）波長範囲（たと

えば赤外および近赤外)における照明を与える点で有利である。すなわち、アップコンバート性燐を免疫組織化学的染色および／または現場でのハイブリッド化につき赤外発生源(たとえば赤外レーザーダイオード)を用い蛍光顕微鏡と組合せて便利な超感度ラベルとして使用することができ、さらに可視範囲ルミネセンスの信号および画像検出につき写真フィルム(たとえばコダック・エクタクローム)として使用することができる(赤外遮蔽フィルタと共にまたはそれなしに)。

。

### 装備の要約

第1図は、本発明により試料15に関する診断を実施するための代表的装置10を示す光学および電子ブロック図である。本発明は1個もしくは複数のレポータを用いて行うことができる。例示の目的で、この装置は2個の燐レポータを使用して単一試料につき2つの診断を行うシステムを示す。第1レポータは $\lambda_1$ に集中する励起バンドと $\lambda_1'$ に集中する発光バンドとを有する一方、第2レポータはそれぞれ $\lambda_2$ および $\lambda_2'$ に集中する励起および発光バンドを有する。本発明のレポータはマルチフォトン励起に依存するので、波長 $\lambda_1$ および $\lambda_2$ は $\lambda_1'$ および $\lambda_2'$ よりも長い。前者は典型的には近赤外であり、後者は可視範囲である。

。

レーザーダイオードまたは発光ダイオード(LED)としうる1対の光源20(1)および20(2)は所望の励起波長にて光を発する一方、光ダイオードとしうる各検出器22(1)および22(2)は所望の発光波長にて光を検出する。発光線は指数法則による入射光束に関係し、したがって効率 $\eta$ は試料に対し明確に集中する入射束を有することにより最大化される。この目的で、2つの光源からの光を適する組合せ素子25により単一光路に合体させ、レンズまたは他の集束メカニズム27により小領域に集束させ、試料に当てる。燐レポータにより放出された光をレンズ30によって集め、2つの発光バンドにおける各成分を適する分離素子32により分離すると共に各検出器に指向させる。

レーザーダイオードを作動させると共に異なる波長バンドにて放出光を検出するための多くの可能な方式が存在する。これを一般的にレーザーダイオードおよ

び検出器に連通する制御電子ブロック 35 として示す。制御電子装置の特定の調時および他の特性を特定実施例につき以下説明する。

異なる発光バンドを有するが共通の励起バンドを有する複数のレポータを存在させることができる。この種の場合、システムは単一のレーザーダイオードにつき複数の検出器を備える。同様に、異なる励起バンドを有するが共通の発光バンドを有する複数のレポータも存在させうる。この種の場合は、システムは単一の検出器につき複数のレーザーダイオードを備え、時間多重化技術などを用いて波長を分離する。

2 個の光源からの光を、共通の集束メカニズムにより単一位置に集中させるよう組合せて示す。これは、たとえば試料の同じ領域を照明することが望ましい場合にも必要でない。同様に、集光は単一集光メカニズムによって行う必要もない。全ての光を保持する必要があるれば、合体および分離素子は波長分割マルチプレクサおよび 2 色フィルタによるデマルチプレクサを備えることができる。損失を許容しうる限り、50%ビームスプリッタおよびフィルタを使用することができる。

図面は、試料を通過してライン内で検出される光を示す。一般的に、燐レポータからの発光は等方性であり、光を入射光の方向から所定角度で集光して励起源からのバックグラウンドを回避することが好ましい。しかしながら、励起バンドおよび発光バンドは広く分離されるので、この種のバックグラウンドは大抵の場合問題にならないと思われる。寧ろ、他の配慮が他の形状を支配する。たとえば、入射光線の光路に沿って戻る光を検出して、光学経路における所定の素子を励起光路と検出光路との間に共有することが望ましい。

共有素子を有する典型的な種類の機器は顕微鏡であって、対物レンズを用いて試料に励起照射線を集中させると共に発光照射線を集める。この種の構成における極めて有利な実施例は光学捕獲の現象を利用する。レポータを小ビーズに結合させる場合は、ビーズを光束焦点近くの領域で捕獲することができる。同一の発生源または異なる発生源を用いてレポータを励起させることができる。小粒子を捕獲するための赤外ダイオードレーザーの使用についてはサトー等、「1.3  $\mu$

m小型InGaAsPレーザーを用いる小粒子の光学捕獲」、オブチックス・レターズ、第16巻、第5号（1991年3月1日）（参考のためここに引用する）に記載されている。

### 特定検出技術

上記に要約したように、多チャンネル検出はたとえばフィルタまたは2色ビームスプリッタのような光学装置を使用し、隣レポータの発光バンドを充分に分離する。同様に、共通発光バンドを有する複数レポータを電子技術により検出することも指摘された。これら電子技術については多重発生源に関し以下説明する。

。しかしながら、これら技術については単一チャンネルに関し最初に説明する。これら技術は、この点に関し、測定しようとする信号と同じ波長範囲にあるバックグラウンドの発生源が存在するので有益である。

第2A図は、単一チャンネルに関し位相敏感検波を実施するための装置を示す。対応する参照符号を上記図面の符号に対応する部材につき使用する。この点に関し、制御電子装置35は波形発生器37と周波数ミキサ40とを備える。波形発生器37は周波数 $f_1$ にてレーザーダイオード20（1）を作動させると共に、 $f_1$ にて信号を周波数ミキサに送信する。さらに周波数ミキサは検出器22（1）から信号を受信すると共に位相制御入力信号を受信する。この回路は、バックグラウンドが測定しようとする信号よりもずっと短い寿命（ミリ秒と比較しナノ秒もしくはマイクロ秒）を有するので、バックグラウンド識別をさらに可能にする。これは、信号およびバックグラウンドが異なる位相を有するようにする（これらは両者とも波形発生器の特徴的周波数にて変調される）。寿命依存性の位相シフトの説明についてはデムトレーダ、レーザー・スペクトロスコピー、スプリング・フェアラーク出版、ニューヨーク（1988）、第557～559頁（参考のためここに引用する）を参照することができる。位相入力信号を制御して、信号を最大化させると共にバックグラウンドに対し識別する。このバックグラウンド識別は、信号を変調すると共にバックグラウンドを変調しない位相敏感検波に典型的な識別とは相違する。未変調バックグラウンドに対する識別もここでは有利であって、2種類の識別を与える。

信号は2-フォトン励起に依存するので、2個の変調レーザーダイオードを使用する共に変調周波数の合計もしくは差にて信号を検出することができる。第2 B図はこの種の配置を示し、第1および第2 レーザーダイオード20 (1) および20 (1)' (同じ波長 $\lambda_1$ または恐らく異なる波長にて発光) はそれぞれ周波数 $f_a$ および $f_b$ で作動する波形発生器37 aおよび37 bからの信号により変調される。波形発生器の出力信号を第1周波数ミキサ42に連通すると共に、 $f_a \pm f_b$ における信号を第2周波数ミキサ45に連通する。検出器22 (1) からの信号および位相入力信号をも周波数ミキサ45に連通する。

第3図はゲート検出の実施装置を示す。バックグラウンドは信号よりも短寿命であるため、検出の遅延は識別向上を可能にする。この目的でレーザーダイオードはパルス発生器50により作動され、その遅延出力を用いてゲート積算器または他のゲートアナライザ55を作動させうる。

第4図は、 $\lambda_1$  および  $\lambda_2$  に集中する励起バンドを有すると共に  $\lambda_3$  近くに重なる発光バンドを有する第1 および第2 レポータを用いた試料に関する診断の実施装置を示す。試料にはレーザーダイオード20 (1) および20 (2) からの光を第1図に関し上記したように照射する。第1 および第2 波形発生器37 (1) および37 (2) はそれぞれ周波数 $f_1$  および  $f_2$  にてレーザーダイオードを作動させ、 $f_1$  および  $f_2$  にて信号を各周波数ミキサ60 (1) および60 (2) に送信する。検出器22 (3) からの信号を両周波数ミキサに連通し、これらミキサはそれぞれ位相入力信号をも受信する。したがって、周波数ミキサ60 (1) は周波数 $f_1$  にて変調された放出光の量に対応する出力信号を発生し、この信号は試料における第1 レポータの存在の尺度となる。同様に、周波数ミキサ60 (2) は周波数 $f_2$  で変調された放出光の量に対応する出力信号を発生し、この信号は試料における第2 レポータの存在の尺度となる。

2種の異なる波長の使用につき、異なる励起バンドを有する2種のレポータに関し上記に説明した。しかしながら、この説明は単一レポータの場合にも適用しうる。励起は2-フォトン過程であるため、2個のフォトンが同じエネルギーを有する必要はない。寧ろ、2個のフォトンの全エネルギーが励起バンド内にある

ことのみが必要である。すなわち、レーザーダイオードで異なる波長を与えるのは比較的簡単かつ安価であるため、より可能な組合せ（すなわちより可能な全励起エネルギーの選択）が存在する。これは、アップコンバータのための稀土類イオンの選択をより容易にする。何故なら、励起工程は単一フォトンエネルギーを含むエネルギー移動一致性に依存する必要がないからである。さらに、他の吸収性イオン（実施例におけるイッテルビウムイオン）からのエネルギー移動を用いることなく中間レベルの共鳴増大を利用して、発光性イオン（上記実施例にてエルビウムイオン）の直接的な段階励起を達成することもできる。さらに、単一レポータにつき異なる波長を用いて、励起依存性多重化およびバックグランド識別技術につき他の手法を与えることもできる。

単一燐の多重波長励起は、第 5 A～5 C 図に示したように多数の方法で生ぜしめることができる。2 個のレーザーは単一イオンの段階的励起を第 5 A 図に示したように生ぜしめる。第 1 レーザーはレベル 1 からレベル 2 への励起を刺激すると共に第 2 レーザーはレベル 2 からレベル 3 への励起を刺激し、このレベルにて発光が生ずる。単一イオン励起は第 5 B 図に示したようにエネルギー移動により生ずることもある。この場合、第 1 レーザーはレベル 1 からレベル 2 への励起を刺激し、エネルギー移動はレベル 2 からレベル 3 まで生じ、第 2 レーザーはレベル 3 からレベル 4 への励起を刺激する。後者の過程の変法においては、レベル 1 および 2 は第 1 イオン（すなわち感作剤イオン）とすることができ、レベル 3 および 4 は第 2 イオン（すなわち活性化剤イオン）とすることができる（第 5 C 図に示す）。

第 5 A 図に示した段階的励起方式においてエネルギー移動は必要でなく、したがって励起レーザーの分極に関する情報が保持されて発光照射線の分極を生ぜしめ、この場合、光の分極解除は信号とバックグランドノイズとの間の識別を向上させうる。

第 5 C 図に示した多重イオンマルチレーザー励起方式については、共通の励起波長を有する数種の燐が存在する。この場合、異なる燐の間の識別は、異なる発光波長に基づきおよび／または時間ゲート、周波数変調および／または位相敏感



検波により励起波長の変調を用いて実施することができる。

#### 特定機器の具体例

第6図は、手持プローブを用いて試料につき本発明を実施するための装置の特定実施例に関する光学列を示す略図である。この実施例は小形化された機器の形態を採用し、ハウジング75（ファントムで示す）と手持プローブとを備えると共に光学繊維接続ケーブル82を備える。光学および電子部品をハウジング内に位置せしめる。例示の目的で、3-チャンネル系の光学部品を示す。試料は、たとえば可視スペクトルの青色、緑色および青色部分における異なる発光バンドを持った3個までのレポータを含むことができる。さらに、レポータは近赤外に異なる励起バンドを有すると思われる。

3個のレーザーダイオード85a～cからの出力ビームを目盛指数（GRIN）レンズ87a～cを介して連通し、各繊維セグメント88a～cの端部に集束させると共に、方向性結合器90または他の適するデバイスによって単一繊維90に連結する。繊維90の端部から発する光をGRINレンズ95により視準し、この光は2色ビームスプリッタ97を通過してGRINレンズ100により光学繊維ケーブル82の端部に再集束する。ビームスプリッタは、レーザーダイオードから赤外線を通過させるが可視光を反射すると思われる。

手持プローブ80はハンドピース102と内部GRINレンズ105と裁頭円錐状の整列チップ110とを備える。繊維82から発する光をGRINレンズ105により整列チップ110を僅かに越えた焦点115に集中させる。整列チップを試料を保持する試験管に近接させて、焦点115を試料に集中させる。試験管はレーザー照射線に対し透過性であると思われる。

試料における焦点115の領域から発する光の1部をGRINレンズ105によって集め、繊維82中に集束させると共にGRINレンズ100により視準し、2色ビームスプリッタ97にて反射させる。この光は3つまでの発光バンドにおける波長を有することができる。光学繊維120a～cは特定成分を各光検出器125a～cに指向させる。特定フィルタ装置を示し、各フィルタは各発光バンドにて光を反射するが、たとえば1個もしくはそれ以上のフィルタが発光バン

ドの帯域フィルタであれば他の配置も使用される。

制御電子装置は図示しないが、上記の時間多重化もしくはヘテロダイン技術を用いることもできる。この種の技術は、たとえば発光バンドが明確でない場合に必要である。

第7A図は、電荷結合素子（CCD）画像形成列150をガラスもしくはプラスチック基板に沈着したペプチドもしくは他の生物学上活性な物質の二次元列152と組合せ検出器として使用する本発明による実施例の図面である。CCD列は重なる不働態化層157を持った多数の個々にアドレスしうる感光性検出素子155を有する一方、ペプチド列は多数の個々の結合部位160を有する。燐を含有するプローブはこのペプチド列における1つもしくはそれ以上の素子に対し反応特異性であり、したがってこれら素子のみに物理的に付着する。ペプチド列は画像形成列に対し1対1の幾何学関係を有するよう示され、1個のピクセルが

ペプチド列における各素子に対応する。しかしながら、必要であれば1群の検出器素子を有する大型ペプチド素子を設けることも可能である。

上記各種の技術を用いて、検出器列により赤外レーザー刺激から燐の発光を識別することができる。

第1に、検出器列の感度範囲を越えたIR刺激に応答する燐を使用することができる。この種の燐の例はガドリニウムオキシスルフィド：10%エルビウムである。この燐は1.5  $\mu$ m照射線により刺激され、960nmおよび520nmにて発光する。検出器列は1.5  $\mu$ m照射線に対し非感受性であるが、アップコンバート照射線に対し感受性である。

さらに、燐発光は立上および下降時間が比較的遅いので、CCD検出器列によりパルスレーザー刺激源から決定した時間とすることができる。アップコンバージョン過程の減衰時間は特定の発光移動および燐ホストに応じて可変である。しかしながら、一般にこれは500  $\mu$ s秒～10msの範囲である。これはレーザー励起パルスおよび検出器列の能力と比較して極めて遅い。

CCD列を加工する技術は、CCD画像形成列が永年にわたり市販入手されているので周知されている。この種の各種のデバイスはダビッド・サルノフ・リサ

ーチ・センター、プリンストン、NJから入手することができる。

ペプチド列を加工する技術はホドル等、「光指向の空間アドレス可能な平行化学合成」、サイエンス、第251巻、第767～773頁（1991年2月15日）（参考のためここに引用する）による論文に記載されている。記載された特定列は1.28 cm×1.28 cmの面積に1024個の別々の素子を有する。

第7A図の実施例は、CCD列と緊密接触したペプチド列を示す。実際に、ペプチドを別途の基質なしに不働化層に対し直接付着させることができる。しかしながら、空間分離された列が好適である場合も存在し、第7B図はペプチド列とCCD列とが分離された実施例を示す。レンズ165の列は各結合部位からの光を集光すると共に、これを各検出素子に集束させる。この配置は、励起照射線を排除する他の技術を使用しない程度までフィルタの使用を容易化させる。

光学捕獲を用いて、粒子上における燐の存在もしくは不存在を決定すべく試料粒子を一時的に固定化することができる。便利には、試料粒子を捕えるべく使用

する波長範囲は選択されるアップコンバート性燐のための励起波長範囲と実質的に同一とすることができ、光学的捕獲および励起照明が同じ発生源で行われる。

第8図は、小粒子の単光束勾配力（single-beam gradient force）捕獲につき使用する装置のブロック図を示す。

#### 蛍光活性化細胞選別

ここに説明したアップコンバート性燐を流動血球測定法による蛍光性細胞選別における燐光ラベルとして使用することができる。従来の蛍光染料と異なり、アップコンバート性燐は遺伝物質および細胞を損傷する波長範囲（たとえばUV）における励起照明を必要としない明確な利点を有する。典型的には、アップコンバート性燐ラベルを、懸濁物における細胞集団のサブ群細胞に存在する細胞表面蛋白に高い親和性および特異性を以て結合するたとえば抗体のような結合試薬に付着させる。燐標識された結合成分を結合条件下で細胞懸濁物と接触させて、細胞表面蛋白を有する細胞が標識結合試薬に結合するようにし、これに対し細胞表面蛋白を欠如する細胞は標識結合試薬に実質的に結合しない。懸濁細胞は、ほぼ1個しか個別細胞が1度に試料検出帯域に存在しないような条件下で試料検出器

に通過させる。典型的には I R レーザーである発生源は各細胞および検出器（典型的には光電子増倍管または光ダイオード）を照明して発光照射線を検出する。検出器は、検出された信号に基づき複数の試料収集領域の 1 つへの検出帯域における細胞のゲートを制御する。F A C S 装置および方法の一般的説明は米国特許第 4, 1 7 2, 2 2 7 号；第 4, 3 4 7, 9 3 5 号；第 4, 6 6 1, 9 1 3 号；第 4, 6 6 7, 8 3 0 号；第 5, 0 9 3, 2 3 4 号；第 5, 0 9 4, 9 4 0 号；および第 5, 1 4 4, 2 2 4 号（参考のため、ここに引用する）に示されている。F A C S 法につきラベルとして使用されるアップコンバート性燐は細胞もしくは遺伝物質を損傷しない励起範囲（好ましくはさらに発光範囲）を有することが好ましい。一般に、遠赤外および赤外範囲における照射が励起に好適である。200～400 nm の範囲の照射はできれば回避すべきであると思われ、波長範囲 760～765 nm は生存細胞の維持が望ましい用途では回避することができる。

### 他の改変

アップコンバートした燐照射線の吸収が高い環境においては、燐微粒子を蛍光染料または染料の組合せにより選択比率で被覆してアップコンバートした周波数で吸収し、次いで他の波長にて再放出させる。これらフルオルに対する単一フォトン吸収断面は典型的には極めて高いので、薄い層のみが燐発光の完全吸収につき必要とされる。この被覆粒子は次いで包封されて適する抗原もしくは抗体レセプタ（たとえば微粒子）にて被覆することができる。この層状化の例を第 9 図に図示する。可視範囲に強力な吸収移行部を有する広範な種類の蛍光染料が存在し、その発光は可視範囲を包含すると共に赤外まで及ぶ。大抵のものは 10% もしくはそれ以上の蛍光効率を有する。このようにして、発光波長は粒子環境を通過するよう企画することができ、光学干渉フィルタを再び使用して、励起波長と発光波長とを識別することができる。試験媒体に比較的大きい波長「ウインドー」が存在すれば、単一種類の燐に被覆しうる発光波長の種類は入手しうる染料および染料組合せの数によってのみ制限される。各種のリポータ間の識別は分光技術およびここに説明した多重化技術により容易に行われる。すなわち、複数標的の

不均質混合物にて案出使用しうるプローブ／レポータ「指紋」の個数は実質的に無制限である。

上記原理は、スペース特異性の光触媒的および光化学的反応を行うにも適用することができる。分光法の選択の他に、燐の長い発光減衰時間は比較的遅い反応もしくは一連の反応を光露出の後の発光時間内に生ぜしめることができる。これは、燐－〔触媒もしくは反応体〕結合体が励起波長の侵入しえない環境に入る際に特に有用である。この遅い放出は、より多数の標的が粒子と相互作用する可能性を増大させる。

燐粒子の独特な減衰速度は動的研究をも可能にする。励起源への連続露出が可能でない或いは浸蝕的であるため望ましくないシステムにおいては、パルス励起に続く遅延蛍光検出が必要である。燐レポータが光励起された後、燐または燐／染料結合体粒子からの発光は典型的には約1ミリ秒間にわたり持続する。動的環境（たとえば運動する標的を有する静的もしくは流動的システム）において、粒子は励起／検出装置に対し相対移動する際に特徴的に減衰する強度の光を発する。システムの規模およびシステム内の速度に適する画像形成光学系と組合せて、

C C D光電気センサ列を用いて列視野を横切る粒子運動を検出する。充分特性化された時間の関数である燐の遅延発光は個々の粒子位置、方向および速度の動的追跡を可能にすると共に、必要に応じ粒子寸法、密度および流体力学構成の計算をも可能にする。粒子が運動する際、これはより多くの列の素子に露出するが常に減少する強度を有する。減衰時間の所定部分にわたり露出される素子が多いほど急速に移動する。したがって、列により収集される粒子発光「トラック」の積算強度パターンは粒子の速度に直接関係する。これら粒子は再びパルスもしくはチョップC W励起源により任意の時間で更新される。第10図はこの経過を示す。「サイドオン」励起および検出のみを図示するが、サイドオンおよびエンドオンの検出および励起配置もしくは組合せも可能である。コンピュータ分析によるC C D列強度情報の整理は、動的に関与するシステムにおける粒子の実時間に近い追跡を可能にする。コンピュータにより行われるデータ分析および整理は燐発光の固有減衰、照明されるピクセルの個数およびその信号レベル、列に対する減

衰信号の方向性、および列の焦点面に対し移動する粒子の錯乱円からの強度寄与を包含する。エンドオン流動検出配置において、錯乱円の寸法は、粒子がどのように迅速に焦点から移動するかに直接関係し、粒子の速度を測定しうる 1 つの可能な手段は反応カラムにおける化学および速度論を監視することであり、或いは流動血球測定に対するこの方法の適用は流体力学特性（寸法、形状、密度）に基づく細胞の解析を可能にする。さらに、この方法はインビボ診断用途（たとえば血液還流速度）にも有用である。

さらにアップコンバート性燐ラベルを用いて、アップコンバート性燐ラベルが結合する領域における温度を検知することもできる。アップコンバート性燐の温度測定法は H. バースウおよび C. K. ヨルゲンセン（1990 年 10 月）、オプティクス・レターズ、第 15（19）巻、第 1100 頁（参考のためここに引用する）に記載されている。

理解を明瞭にする目的で例示のため本発明を詳細に説明したが、本発明の範囲内で多くの改変をなしうることが了解されよう。

以下、限定はしないが実施例により本発明をさらに説明する。

### 実験例

#### レポータとしてのアップコンバート性無機燐の確認

イッテルビウム-エルビウムでドープされたナトリウムイットリウムフルオリドからなるアップコンバート性燐粒子をサブミクロン寸法まで微粉碎し、粒子寸法により分別すると共に、ポリカルボン酸で被覆した。Na (Y<sub>0.80</sub> Yb<sub>0.18</sub> Er<sub>0.02</sub>) F<sub>4</sub> を範囲 940～960 nm における励起に基づくその高効率につき選択した。Nd; Yag ポンプ染料レーザー／IR 染料組合せを用いて、上記周波数範囲における 8 ns～10 ns 時間のパルスを発生させた。

レーザーパルスを用いて液体における微粉碎燐粒子の懸濁物を照明すると共に、その場でガラススライドに付着させた。直角で観察された懸濁物ルミネセンスを集光レンズと最大可能範囲まで分散励起光を濾過する空間フィルタと光電子増倍管と減圧光ダイオードもしくは簡単な固相光ダイオードとを用いて監視した（観察される光レベルに応ずる）。

ルミネセント信号レベルを溶液pH（範囲6～8）、粒子寸法、粒子量（ $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ ）および安定化用陰イオン型表面活性剤の種類の関数として決定した。信号をボックスカー積算器および長RC時間定数からの時間積分として或いは一時的デジタイザによる一時的信号として記録し、特定実験条件下におけるルミネセンス寿命を示した。その場での信号をもレーザー走査顕微鏡法により測定した。第11図は977.2nmの波長最大におけるレーザー源での励起に入射する燐発光スペクトルの蛍光走査図であり、発光最大は約541.0nmである。第12図は燐励起スペクトルの励起走査図であり、発光収集ウインドーを541.0nmに設定し、燐の励起最大を541.0nmに設定し、発光波長を約977nmに設定した。第13図は励起照明の終了後における541.0nmの燐ルミネセンスの時間一減衰測定図である。最大燐光は約400 $\mu\text{s}$ で出現し、約1000 $\mu\text{s}$ にて燐光の低い安定レベルまで徐々に減衰する。第14図は燐発光強度を励起照明強度の関数として示す。燐光強度は励起強度と共に、ほぼ約1000 $\text{W}/\text{cm}^3$ まで増大する。

サブミクロンのNa（Y<sub>0.8</sub> Yb<sub>0.12</sub> Er<sub>0.08</sub>）F<sub>4</sub>粒子の燐光効率を測定した。Ti：サファイヤレーザーを励起源として使用すると共に、分光光度計および光電子増倍管を検出システムとして使用した。2種類の測定を行った。第1の

測定は、燐懸濁物につき粒子1個当りの絶対発光を540nmおよび660nmにおける発光バンドで測定する直接的測定とした。検定した断面を第15図に示し、寸法依存性を第16図に示す。これは、975nmにおける励起光および約20 $\text{W}/\text{cm}^3$ の強度にて0.3 $\mu\text{m}$ の粒子につき約 $1 \times 10^{-16} \text{ cm}^2$ の燐光断面に相当する。約25 $\mu\text{m}$ の乾燥燐粉末の発光効率も測定した。結晶ホストにおけるYb<sup>+3</sup>の吸収断面に関する既知の数値[ラコバラ等（1991）、オブチックス・レタース、第16巻、第1089頁、参考のためここに引用する]および粒子寸法に対する燐光発光の測定された依存性に基づき、約 $1 \times 10^{-15} \text{ cm}^2$ の燐光断面が判明した。これら2種の測定値の間の差は、乾燥燐と水性懸濁液との間の燐光効率の差または乾燥燐における多重分散フォトンの吸収に起因する。これら断面推定値のいずれかに基づき、断面は中庸レーザー強度における単一サブ

ミクロン燐粒子の検出を可能にするのに充分大である。約  $10\text{ W}/\text{cm}^2$  のレーザー強度にて燐光はレーザー強度として1.5乗まで増大する。

#### 燐粒子性能：検出の感度

( $\text{Y}_{0.86} \text{ Yb}_{0.08} \text{ Er}_{0.06}$ )<sub>2</sub>O<sub>2</sub>Sよりなる単分散の  $0.3\text{ }\mu\text{m}$  アップコンバート性燐粒子のシリーズ希釈物を含有する一連のテラサキプレートを、IRダイオードレーザー照明の下でプロトタイプ機器でアップコンバージョン蛍光につき試験した。

燐粒子をDMSOでの沈降により作成し、0.1%アラビヤゴム水溶液にシリーズで希釈した。これは全ゆる水分散問題を完全に排除すると思われた。使用したシリーズ希釈物を第III表に示す。

第III表

| ラベル       | 燐充填量<br>(ng/穴1個)     | 燐充填量<br>(粒子数/穴1個)          | 等価検出感度<br>(M)       |
|-----------|----------------------|----------------------------|---------------------|
| $10^0$    | $1700 \pm 90$        | $23,600,000 \pm 1,200,000$ | $4 \times 10^{-12}$ |
| $10^{-1}$ | $170 \pm 9$          | $2,360,000 \pm 120,000$    | $4 \times 10^{-13}$ |
| $10^{-2}$ | $17 \pm 0.9$         | $236,000 \pm 12,000$       | $4 \times 10^{-14}$ |
| $10^{-3}$ | $1.7 \pm 0.09$       | $23,600 \pm 1,200$         | $4 \times 10^{-15}$ |
| $10^{-4}$ | $0.170 \pm 0.009$    | $2,360 \pm 120$            | $4 \times 10^{-16}$ |
| $10^{-5}$ | $0.017 \pm 0.0009$   | $236 \pm 12$               | $4 \times 10^{-17}$ |
| $10^{-6}$ | $0.0017 \pm 0.00009$ | $23.6 \pm 1.2$             | $4 \times 10^{-18}$ |

保存DMSO分散物は、4-1 mL試料を蒸発させることにより重力測定して、 $1.70 \pm 0.09\text{ mg/mL}$  (95%信頼限界)の燐密度を有した。これは  $23.6 \times 10^9$  粒子/mLに相当する ( $0.3\text{ }\mu\text{m}$ の平均粒子寸法および  $3\text{ g/mL}$ の粒子密度と仮定する)。110~120℃にて週末にわたり試料を



蒸発させた後の残留物は顕著に黄色であったが、I R ダイオードレーザーで試験した際に燐光を発した。

目に見える緑色光が  $10^{-3}$  (すなわち  $0.7 \mu\text{g}/\text{mL}$  もしくは  $23.6 \times 10^6$  粒子/ $\text{mL}$ ) までの全てのシリーズ希釈物から、 $1 \text{ mL}$  のポリプロピレン微小遠沈管で手持ダイオードレーザーにより暗室にて発した。 $10^{-1}$  および  $10^{-2}$  希釈物は肉眼で濁っていた。各シリーズ希釈物の  $1 \mu\text{L}$  またはその次の高い希釈物の  $0.1 \mu\text{L}$  をピペットでテラサキプレートの穴に入れた。 $1 \mu\text{L}$  は穴の底部を埋め、 $0.1 \mu\text{L}$  は穴の縁部に沿って広がったが全表面を覆わないことが判明

した。低い粒子濃度を有する小容積に関連した統計的問題およびピペット操作問題のため、2～4反復を各希釈物につき作成した。

テラサキプレートの穴は  $10 \mu\text{L}$  容積の試料を保持する。この容積に含まれる全燐粒子が試料穴の底部に付着すると仮定して、等価検出器感度を推定することができる(第I I I表)。 $10^{-15} \sim 10^{-18} \text{ M}$  が酵素結合表面分析の正常範囲であることに注目すべきである。

#### 比較試料の結果

比較試料を、プロトタイプのアップコンバージョン蛍光測定装置(ダビッド・サルノフ・リサーチ・センター)を用いて走査した。モータ操作X-Y位置決定段階を用い、プレートを赤外ダイオードレーザーの焦点に対し  $50 \mu\text{m}$  増し分にて移動させることにより試料を走査した。

I R ダイオードレーザーを  $63 \text{ mW}$  ( $100 \text{ mA}$ ) にて操作した。ビームを焦点に  $2.4 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$  まで集束させた。試料穴の底部が約  $1.4 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$  (直径  $1365 \mu\text{m}$ ) であるため、ビームは個々の位置にて穴底部表面の17%以下を覆う。さらに穴は傾斜側壁部をも有し、この側壁部は試料穴の底部から頂部まで拡開すると共に徐々に発散するレーザービームにより応答する。光学系におけるロスを無視し、焦点(試料穴の底部)のI R光強度は  $980 \text{ nm}$  の波長にて約  $26 \sim 27 \text{ W}/\text{cm}^2$  であった。光電子増倍管(PMT)を試料から放出される可視光(アップコンバート光)の検出に使用した。レーザービーム幅は試料穴の底部における表面積よりも小さいので、プレートをダイオードレーザー

の焦点に対し肉眼検査により整列させて、レーザーを中央穴に集中させた（穴C 5、C 6およびC 7を読取る際にはC 6また穴D 5、D 6およびD 7を読取る際にはD 6とした）。

PMT信号（amp）を各プレート位置で記録し、試料穴の幅（約4000  $\mu$ m）にわたり数字的に積算した。 $10^{-2} \sim 10^0$ 希釈試料の穴における種々異なる位置で数回の走査を行って、粒子分布の均一性を決定した。4000  $\mu$ m距離にわたるPMTの平均的暗視野電流を積算することによりバックグランド信号を決定して、 $1 \times 10^{-9} \mu$ ampの積算バックグランド信号を得た。試料穴の積算値をこのバックグランド信号に変換し、これを第19図に示す。

#### 免疫診断試料検出

免疫収着分析形式におけるアップコンバート性燐レポータの能力を示すため一連のIgG／抗-IgG試料を作成した。これら試料は抗原（マウスIgG）および牛血清アルブミン（BSA）で被覆された6個の個々の穴（陽性試料）、並びにBSAのみで被覆された6個の穴（陰性比較）で構成した。ヤギ抗-マウスIgG抗体（抗-IgG）で被覆した公称0.3  $\mu$ mの（Y<sub>0.86</sub> Yb<sub>0.08</sub> Er<sub>0.06</sub>）<sub>2</sub>O<sub>3</sub>燐粒子を次いでレポーター抗体結合体として使用した。

透明なポリスチレン製テラサキプレートの6個の穴（C 5、C 6、C 7、D 5、D 6およびD 7）をマウスIgGで被覆し、その際37℃にて燐酸塩緩衝塩水（PBS）における5  $\mu$ Lの100  $\mu$ g／ $\mu$ LマウスIgG溶液に対し培養した。1時間の後、この溶液を吸引すると共に各試料穴をPBSにおける10  $\mu$ Lの3%BSAで洗浄した。これを直ちに吸引除去し、PBSにおける20  $\mu$ Lの3%BSAで置換した。各試料穴をBSAで後被覆し、その際20  $\mu$ LのBSA／PBS溶液に対し37℃で1時間培養した。後被覆溶液を吸引除去し、プレートを4℃にて1晩貯蔵した。これら穴を陽性試料とみなした。第2のテラサキプレートにおける同じ6個の穴を同様に作成したが、ただしマウスIgGで被覆しなかった。この第2群の試料穴を陰性比較とみなした。

#### 燐-抗体結合体

乾燥燐をDMSOに懸濁させることにより、（Y<sub>0.86</sub> Yb<sub>0.08</sub> Er<sub>0.06</sub>）<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

S 燐粒子の溶液を作成した。初期粒子密度は、光学顕微鏡の視野に含まれる粒子の個数を計数することにより測定して、約  $10^7$  粒子/mL であった。0.3  $\mu$ m の基礎粒子寸法は顕微鏡の解像限界以下であることに注目すべきである。この溶液を3日間にわたり乱すことなく沈降させた。濁って恐らく殆ど単分散の小粒子を含有する上澄液をその後の結合に使用した。

ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Ab) を DMSO 分別された燐粒子に (吸着により) 結合させた。これは、200  $\mu$ L の Ab 溶液 (0.1 M トリス HCl、pH 7.2 における) を DMSO における 100  $\mu$ L の燐懸濁物と混合して行った。数種の異なる Ab 濃度を 0.025 ~ 1  $\mu$ g/ $\mu$ L の範囲で試みた。0.25  $\mu$ g/ $\mu$ L の濃度が最も効率的な被覆をもたらすと思われた (すなわち、最小の燐

粒子の凝集を伴って最大の Ab 利用率)。燐を室温にて1晩にわたりこの DMSO/トリス溶液における Ab とゆっくり攪拌しながら平衡化させた。得られた燐-Ab 結合体をこの溶液から遠心分離すると共に、後被覆するため PBS における 3  $\mu$ g/mL の BSA 溶液に再懸濁させた。得られた BSA/PSA 再懸濁物を分析のため直接使用した。

燐に対する Ab 吸着程度および残留 Ab 活性のを、燐結合した Ab をフルオレセインイソチシアネート (FITC) 結合マウス IgG で滴定して測定した。得られた FITC 標識燐をサイテロン・アブソルート流動血球測定計に通過させ、この測定計は粒子の相対寸法を測定することができる。2種の異なる寸法のサブ集団を観察し、計数した粒子の約 65% が小さい恐らく単分散の粒子として出現し、35% がずっと大きい恐らく凝集体として出現した。小さいサブ集団の 60% のみが著量の活性 Ab を有すると思われた (FITC 蛍光により測定)。目的とする凝集体のうち、約 90% が活性 Ab を含有すると思われた (FITC 蛍光による)。これは、燐-Ab 結合体の 40% 未満が適する寸法 (公称 0.3  $\mu$ m) であって抗マウス IgG 活性を示したことを示唆する。燐-Ab 結合体の同様な割合 (31%) が活性であったが、顕著に大きい燐レポータを有した。

PMT 信号 (amp) を各プレート位置で記録し、試料穴の幅 (約 4000  $\mu$

m) にわたり数値的に積算した。平均信号（95%信頼限界）は次の通りであった：

陽性試料の平均値 =  $1.30 \times 10^{-4} \pm 1.25 \times 10^{-4} \mu\text{a-m}$ ；

陰性比較の平均値 =  $4.20 \times 10^{-6} \pm 6.82 \times 10^{-6} \mu\text{a-m}$ 。

陽性試料および陰性比較は99.9%信頼レベルにて統計的に相違する。陽性試料は平均で陰性比較よりも30.0 ± 29.7倍多い光を発する。

#### 生物学的巨大分子に対する燐の結合

生化学レポータとしてのアップコンバート性燐に関するパラメータをさらに評価するため、生物学的リンカを燐粒子に付着させた。ナトリウムイットリウムフルオライド-イッテルビウム/エルビウム燐粒子をストレプトアビジンで被覆した。燐単独およびストレプトアビジンで被覆された燐の励起および発光スペクト

ル特性を測定し（第17A、17B、18Aおよび18B図）、未被覆およびストレプトアビジン被覆の両燐はその吸収および発光特性においてほぼ同一であり、このことは巨大分子リンカ（たとえば蛋白）の付着がたとえ存在したとしてもアップコンバート性燐の燐光性に対し殆ど作用を示さないことを示唆する。次いでストレプトアビジン被覆された燐はビオチニル化された磁性ビーズに特異的に結合し、これはたとえば免疫分析、免疫組織化学、核酸ハイブリッド化および他の分析のような生化学分析におけるレポータとしてのリンカ結合無機燐の利用可能性を示す。磁性ビーズ技術は溶液からのビオチン結合ストレプトアビジン被覆燐の容易な分離を可能にし、磁性ビーズが固体基質であるサンドイッチ分析につき特に適している。

有利には、ストレプトアビジン-ビオチン化学は、アップコンバート性燐レポータが適している各種の生物学的分析に広く使用される。第20図は、限定はしないがたとえばアナライト（たとえば抗原標的）をビオチニル化抗体に結合させることにより溶液中のアナライトを検出するための免疫分析の1実施例を示し、ここでアナライトは固体支持体（たとえば磁性ビーズ）に固定化されたサンドイッチ複合体を形成し、これは最初に固体基質に直接結合した第1結合成分を第2結合成分（たとえばビオチニル化抗体）に結合させて行われる。次いでストレプ

トアビジン被覆されたアップコンバート性燐はサンドイッチにおけるビオチニル化抗体に特異的に結合して、固体支持体におけるサンドイッチ複合体の形成をリポートするよう作用する（これはアナライト濃度の尺度である）。固体基質が磁性ビーズである場合、これは磁気分離により試料溶液から容易に除去され、サンドイッチ複合体におけるビーズに付着した燐の量は特定アップコンバート性燐光を測定して決定される。すなわち、サンドイッチ複合体の燐光はアナライト濃度の定量的尺度を与える。

さらにビオチニル化ポリヌクレオチドもハイブリッド化プローブとして便利に使用され、これらプローブはストレプトアビジン被覆アップコンバート性燐により結合されてハイブリッド形成をリポートすることができる。

#### 生物学的試料におけるバックグランド燐光

免疫分析における生じうるバックグランドを決定すべく、2種の生物学的試料にてバックグランド信号を測定した。唾液および尿を、燐光感度測定（上記）につき使用したと同じ装置で試料として使用した。光電子増倍管の暗電流により設定されたシステムのノイズレベルより高いバックグランドレベルは観察されなかった。このノイズレベルは数百個の粒子/ $\text{cm}^3$ の程度にて信号の検出を可能にする。これは、システムの検出量にて単一の粒子に近い。

光電子増倍管はアップコンバート性燐の高感度測定につき好適な検出器の選択である。何故なら、光電子増倍管はアップコンバート（すなわち発光）された波長にて高い量子効率を発生すると共に長い励起波長の範囲では反応しないよう選択しうるからである。

#### 燐標識抗体による細胞抗原の検出

ストレプトアビジンを上記と同様にアップコンバート性燐粒子に付着させる。マウスのリンパ腫細胞ラインE L-4を、30 k D細胞表面E L-4 C D 3 Tリンパ球分化抗原に対し特異的に結合するハムスター抗-C D 3抗体で検査する。次いで一次ハムスター抗体をビオチニル化ヤギー抗ハムスター二次抗体により特異的に結合させる。次いでビオチニル化された二次抗体をストレプトアビジン-燐結合体で検出する。この種類の多重抗体付着および標識を抗体レイヤリング

(layering) と称する。

複数層の付加（たとえば一次ハムスターA bとヤギー抗ハロスターA bとの結合に続く、ビオチニル化ウサギー抗ヤギーA bとの結合）を用いて、標的から燐を分離する距離を増大させる。信号強度と標的検出特異性とに対するレイヤリング作用を検量すると共に、1つの層（一次抗体はビオチニル化される）から少なくとも5層への層抗体レイアリングを行いかつE L-4細胞におけるC D 3を検出するための最適層数を確認することにより個々の使用につき最適化した。

第21図は、励起スペクトルおよび／または発光スペクトルに基づいて識別しうる燐を用いた2種のE L-4細胞表面抗原の同時的検出を図示する。第21図に示した方式における両抗原の検出は、A b層状化試料と共に培養する前にストレプトアビジン被覆燐（No. 1もしくはNo. 2）に結合させるビオチニル化末端抗体を使用する。すなわち、燐-抗体特異性はストレプトアビジンと一次抗体結合試料と共に培養する前に予備生成されるビオチンとの間の異常に強い（K

約  $1 \times 10^{15} \text{ M}^{-1}$ ）非共有結合により保持される。各抗原の定量は、それぞれ個々の燐物質に起因する異なる信号を検出して行われる。燐光信号は励起スペクトル、発光スペクトル、蛍光減衰時間またはこれらもしくは他の性質の組合せに基づいて識別することができる。

第22図は、さらにバックグラウンド識別を与える位相敏感検波の装置の図面である。パルスもしくは周波数ミキサを、信号を通過させると共に最大バックグラウンド排除のため周波数検定の後にバックグラウンドを識別するよう設定する。

#### アビジンに対するアップコンバート性燐ラベルの共有結合

アップコンバート性イットリウム-イッテルビウム-エルビウム ( $Y_{0.86} \text{ Yb}_{0.08} \text{ Er}_{0.06}$ ) オキシスルフィド ( $O_2 S$ ) 燐を次の手順によりアビジンに結合させた：

単分散アップコンバート性燐粒子を、アルクレスにより詳述された手順〔シリコン化合物：レジスタ・アンド・レビュー、ヒルス・アメリカ、第59～75頁（1991）〕に従いチオプロピルトリエトキシシラン（Huls）でシラン化した。これはチオプロピルトリエトキシシラン（2 g）と95%水性エタノー

ル(100 mL)とを500 mLの三角フラスコに添加して行い、2分間攪拌した。次いで、DMSOにおける約8 mLの65 mg/mL 燐懸濁物を混合物に添加した。この懸濁物をさらに2分間攪拌し、次いで遠沈管に移して遠心分離することにより燐粒子を分離した。ペレットをそれぞれ95%水性エタノールで遠心分離して2回洗浄した。得られた粒子を集め、減圧下で約30℃にて1晩乾燥させた。所定量(127 mg)の乾燥シラン化燐を1.5 mLのDMSOに再懸濁させた(燐保存液)。

1.0 mLの硼酸塩緩衝液(50 mLの脱イオン水における954 mgの硼酸ナトリウム十水塩および17.7 mLの0.1 M HCl、pH 8.3)に1.19 mgのアビジン(ピラス社)を含有する溶液を作成した(アビジン保存液)。1.2 mLのDMSO中に1.7 mgのN-スクシニミジル(4-イオドアセチル)-アミノベンゾエート(ピラス・ケミカル社)を含有する他の溶液を作成した(SIAB保存液)。所定量(10  $\mu$ L)のSIAB保存液を1.0 mLのアビジン保存液に添加し、室温にて30分間攪拌してSIABのN-ヒドロキシスクシミドエステルをアビジンにおける第一アミンと反応させた(アビジン-SIAB保存液)。

1.0 mLの硼酸塩緩衝液(pH 8.3)を含有する20 mLのシンチレーション小瓶を作成した。次いで、この小瓶に対し次の添加を行った：21.6  $\mu$ Lのアビジン-SIAB保存液に続く1.5 mLの燐保存液。この反応混合物を暗所にて室温で1晩攪拌して、SIAB活性化アビジンをシラン化燐表面に存在するチオール基と反応させ、燐粒子に対するアビジンの共有結合を生ぜしめた。

1晩培養した後、1.0 mLの反応混合物を遠心分離し(10,000 gにて1分間)、上澄液を除去した。ペレットを1.0 mLの燐酸塩緩衝塩水(pH 7.2、ピラス社)に再懸濁させ、再び遠心分離して未結合の蛋白を燐から洗浄除去した。この洗浄工程を反復した。洗浄されたペレットを1.0 mLの燐酸塩緩衝塩水に再懸濁させ、下記する診断分析に直接使用した。

#### 測定装置

燐試料からの蛍光スペクトルを測定すべく改変SLMアミンコ48000型フ

ルオリメータを使用した。この装置の改変はレーザーダイオード（ダビッド・サルノフCD-299R-FA No. 13）を付加することからなり、これをポート3によりフルオリメートに入力した。このレーザーダイオードは $\lambda = 985.1 \text{ nm}$ にて発光する。ダビッド・サルノフ・リサーチ・センターにより提供されるスペクトルデータも $980.2 \text{ nm}$ にて小ピークを示す。このピークは、 $985 \text{ nm}$ におけるピーク強度の15%を有する。

5. 08 cm焦点長さのレンズを用いてダイオードレーザービームを視準した。IRレーザー光線の出力は、75 mAの作動電流にてキュベット位置で6.1 mWとして測定された。このビームはキュベットの中心に集束しなかった。これはフルオリメータ励起モノクロメータからの標準可視光線についても言える。レーザーダイオードビームはキュベットホルダに突入する際に発散し、セルの中心に達する時点で約4 mm (H)  $\times$  2 mm (V) となる（セル壁部および液体の屈折率における変化を無視する）。

放出される光をモノクロメータで走査すると共に、励起光の方向から $90^\circ$ にて光電子増倍管(PMT)により検出する。改変SLMアミンコ48000の型

フルオリメータ検出限界は、PBSにおける $4 \times 10^{-16} \text{ M}$  (1 mL当り240,000個の燐粒子)までシリーズ希釈して決定した。スペクトルにおける燐発光ピークは $406 \pm 2 \text{ nm}$ 、 $434 \pm 2 \text{ nm}$ 、 $522 \pm 2 \text{ nm}$ および $548 \pm 2 \text{ nm}$ の波長にて見られた。最大ピークは $548 \text{ nm}$ であった。 $548 \text{ nm}$ ピークの強度を用いて試料を識別した。

#### 細胞表面マーカーに対するアビジン-燐結合体の結合

リンパ芽球腫細胞ライン（ヒト遺伝子突然変異細胞寄託No. GM 07090）を、15%熱失活胎児牛血清を含有するRPMI 1640培地で培養した。細胞の懸濁物（ $10^7$ 細胞）を遠心分離し、等容積の燐酸塩緩衝塩水(PBS) (pH 7.4)に再懸濁させた。細胞をPBSで2回洗浄し、 $5 \times 10^6$ 細胞/mLの最終濃度まで再懸濁させた。次いで、これら細胞をヒト $\beta_2$ -マイクログロブリン（すなわち種類I組織適合性抗原）に対するマウスIgG1モノクローナル抗体と共にポリスチレン遠沈管で培養した。細胞を $4^\circ\text{C}$ にて30分間にわ



たり  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$  の抗体濃度にて免疫沈殿させた。これら細胞を遠心分離により回収し、PBSで2回洗浄し、PBSに再懸濁させ、次いで6本の新たな遠沈管に分けた ( $250 \mu\text{L}$ )。これら試料の4種にはビオチニル化ヤギ抗マウス IgG を添加する一方、残余の2種には FITC 標識ヤギ抗マウス IgG を添加した。これら免疫沈殿は、 $400 \mu\text{L}$  の容積にて  $4^\circ\text{C}$  で30分間にわたり  $20 \mu\text{g}/\text{mL}$  の最終的な第2抗体濃度にて行った。細胞を回収すると共に上記と同様にPBSで洗浄したが、 $50 \mu\text{L}$  の封鎖用緩衝液 (PBSにおける0.2%精製カゼイン、トロピックス社、ベッドフォード、MA) に再懸濁させた。細胞-抗体複合体をこの溶液にて室温で30分間にわたり封鎖し、次いで新たな試験管に移した。

アビジン-燐結合体、アビジン-FITC、アビジンまたは未結合燐のいずれかである予備封鎖された懸濁物 ( $40 \mu\text{L}$ ) を、ビオチニル化抗マウス IgG (H&L) と結合した細胞試料の4種に添加した。さらに、同量の予備封鎖されたアビジン-燐または未結合燐を非ビオチニル化 FITC 標識抗マウス IgG (H&L) で免疫沈殿された残余の2種の細胞試料に添加した。アビジン-レポータ結合体または陰性比較を次のように予備封鎖した。アビジン-燐および燐

単独を、 $100 \mu\text{L}$  の最終容積まで  $10 \mu\text{L}$  の  $6.7 \text{ mg}/\text{mL}$  懸濁物を添加することにより封鎖緩衝液で希釈した。アビジン-FITCおよびアビジン単独比較をも、 $100 \mu\text{L}$  の最終容積まで  $27 \mu\text{L}$  の  $2.5 \text{ mg}/\text{mL}$  溶液を添加することにより封鎖緩衝液で希釈した。これら試薬を室温にて3時間にわたり中間的に再懸濁しながら封鎖し、次いでビオチニル化もしくは非ビオチニル化第2抗体で標識された  $50 \mu\text{L}$  の細胞に添加した。アビジン-ビオチン反応を、時々再懸濁させながら室温にて30分間行った。遠心分離により細胞を回収すると共に封鎖用緩衝液で2回洗浄することにより反応を停止させた。これら試料を  $100 \mu\text{L}$  の封鎖用緩衝液に再懸濁させ、4~5分間にわたり沈降させた。画像形成用のスライドを、 $5 \mu\text{L}$  の沈降細胞を試験管の底部からピペット採取することにより作成した。細胞を適する条件下での共焦点レーザー顕微鏡法により画像形成して、細胞表面 FITC およびアップコンバート性燐信号を観察した。これら観察を

第I V表に要約する。

残余の試料を用いて、ヒツジ抗マウスIgGと結合した常磁性ポリスチレンビーズを再懸濁させた。6種の各試料につき、 $3 \times 10^7$ ビーズを封鎖用緩衝液で室温にて1時間にわたりエッペンドルフ管中で予備洗浄した。緩衝液を、エッペンドルフ管を磁気ラックに入れながら吸引して除去した。抗マウスIgGを有する磁性ビーズを抗体標識細胞に室温にて1時間にわたり間歇的に再懸濁させながら結合させた。次いで磁性ビーズを磁気ラックに集め、封鎖用緩衝液で4回洗浄し、 $100 \mu\text{L}$ の封鎖用緩衝液に再懸濁し、新たなチューブに移し、次いでアップコンバート性蛍光をフルオリメータで測定した。

蛍光につき走査するため発光モノクロメータバンド幅を8 nmに設定し、スペクトルを500～700 nmにて2 nmの段階寸法で走査した。さらに試料を2 nmのバンド幅にて $\lambda = 490 \text{ nm}$ で $37 \mu\text{M}$ により励起させてFITC信号につき測定した。励起波長(490 nm)および発光波長(514 nm)はFITCにつき極めて近似するので、分離可能な信号を得るには蛍標識の場合よりも高い解像が必要とされた。490 nm信号の強度は穴の中心にて $240 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ であった。FITC発光スペクトルを450 nmから750 nmまで2 nmのバンド幅にて発光モノクロメータにより0.5 nmの増し分にて走査した。試

料1は陽性比較であり、最高の発光信号を明かに与えた。試料2は、試料に対する蛍の非特異的吸着が制限されると共にアビジン結合蛍に起因する信号から容易に識別されることを示し、さらにアビジン結合蛍がプローブと結合する際にのみ、この実施例ではビオチン-アビジン結合を介して特異的に結合しうることを示す。試料3は陰性比較であって、蛍を含有せず、アビジンのみを含有する。試料4はFITC結合アビジンを示す。FITC信号はレーザー顕微鏡法により細胞表面で観察されたが、これら信号はFITCの測定につきフルオリメータでの検出レベルより低く、また試料には蛍が存在しなかったので顕著な蛍信号も存在しなかった。試料5および6は、FITC結合一次抗体を検出することができ、さらに蛍もしくはアビジン-蛍の存在が標的抗原に対する一次抗体の結合を顕著には阻害しないことを示す。

第IV表

| チューブ | ヤギ抗マウス<br>IgGの種類 | アビジン<br>結合体    | 細胞表面<br>燐信号 | 細胞表面<br>FITC信号 |
|------|------------------|----------------|-------------|----------------|
| 1    | ビオチニル化           | アビジン<br>- 燐    | +           | -              |
| 2    | ビオチニル化           | 燐              | -           | -              |
| 3    | ビオチニル化           | アビジン           | -           | -              |
| 4    | ビオチニル化           | アビジン<br>- FITC | -           | +              |
| 5    | FITC標識           | アビジン<br>- 燐    | -           | +              |
| 6    | FITC標識           | 燐              | -           | +              |

#### DNAに対するアビジン-燐結合体の結合

プラスミドDNA (25  $\mu$ g) の20mMのdGTPと20mMのdCTPと20mMのビオチン-14 dATPと13mMのdTTPと7mMのジゴキシゲニン-11 dUTPとの存在下にニック翻訳すると共に、エタノール沈殿により精製した。ビオチニル化されたジゴキシゲニン標識断片の平均寸法は、ゲル電気泳動により推定して200~300ヌクレオチドの範囲であると推定された。約20  $\mu$ gのDNAを、200  $\mu$ L容積における10  $\mu$ g/mLのマウスモノクローナル抗ジゴキシゲニンIgG1溶液(PBS)により22℃にて1時間にわたり免疫沈殿させた。DNAを含有しない均等な反応物も作成した。これら2種の試料のそれぞれを次いで3本の新たなエッペンドルフ管に分け入れた(50  $\mu$ L)。

アビジン結合体を、500  $\mu$ gのアビジン-燐懸濁物、未結合燐懸濁物またアビジン溶液を300  $\mu$ Lの封鎖緩衝液で希釈して室温で1時間にわたり封鎖した。各試料(第V表に要約する)のそれぞれにつき、50  $\mu$ Lの抗ジゴキシゲニ

ン結合体を  $150\ \mu\text{L}$  の予備封鎖されたアビジン結合体もしくはアビジンに添加し、室温にて30分間培養した。

ヒツジ抗マウス IgG（封鎖緩衝液で予備封鎖）と結合させた  $3 \times 10^7$  個の常磁性ビーズを再懸濁させることにより未結合アビジン-結合体を除去した。間歇的に再懸濁しながら室温にて30分間培養した後、ビーズを磁気ラック上で分離すると共に PBS で4～6回洗浄した。抗体-DNA結合ビーズを次いでフルオリメータで測定した。

各試料を8nmのバンド幅および2nmの段階寸法にて500～700nmで走査した。示した各PMT値（第V表）は5回の走査の平均値を示す。試料1は最高のPMT信号を与えると予想される。何故なら、ビオチニル化DNAが存在してアビジン結合隣に結合しうるからである。試料2は、顕著でないことが判明した試料への隣の非特異的吸着のレベルを示す。何故なら、PMT信号は隣を含有しない陰性比較（試料4）におけると同じであると観察されたからである。試料3は他の比較であって、アビジン結合隣がDNAの不存在下で常磁性ビーズに結合しないことを示す。試料5および6は分析を確認すべく用いたFITC標識アビジンの結果を示す。

## 第V表

## アップコンバート性燐核酸診断分析の結果

| 試料 | DNA                           | レポータ              | PMT信号<br>(V @546nm) | PMT信号<br>(V @514nm) |
|----|-------------------------------|-------------------|---------------------|---------------------|
| 1  | ジゴキシゲニン<br>及びビオチンで<br>標識したDNA | アビジン<br>結合燐       | 6.1297              | 2.4788              |
| 2  | ジゴキシゲニン<br>及びビオチンで<br>標識したDNA | シラン化<br>燐         | 1.0528              | 4.4022              |
| 3  | DNAなし                         | アビジン<br>結合燐       | 1.6302              | 3.5779              |
| 4  | ジゴキシゲニン<br>及びビオチンで<br>標識したDNA | アビジン              | 0.8505              | 2.8067              |
| 5  | ジゴキシゲニン<br>及びビオチンで<br>標識したDNA | FITC<br>-アビジ<br>ン | 1.0484              | 8.4394              |
| 6  | DNAなし                         | FITC<br>-アビジ<br>ン | 1.0899              | 3.5779              |

## 燐ダウンコンバージョンの評価

( $Y_{0.86}$   $Y_{b0.08}$   $E_{r0.06}$ )<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S 燐の試料をダウンコンバート信号の存在につき走査した。これは、上記単分散燐の試料 (DMSO中  $4 \times 10^{-12}$  M) を 350 nm にて励起源につき 16 nm バンド幅で 1.3 mW の単色光により励起

させて行った。検出は、この試料を 350 ~ 800 nm にて 8 nm のモノクロメータバンド幅で走査することにより行った。走査は 2 nm の増し分で行った。ダ

ウンコンバージョンは観察されなかった。さらに、タンケ等（米国特許第5, 043, 265号）に引用された励起波長でもダウンコンバージョンは見られなかった。すなわち、試験したアップコンバート性燐はタンケ等に報告されたものとは異なる。

### 均質分析

アップコンバート性燐に特徴的なマルチフォトン活性化法を開発して、試料洗浄工程を必要としない分析を行うことができる。未結合の燐ラベルを試料から除去する必要がないこの種の診断分析をここでは均質分析と称し、プソイド均質分析と称することもできる。

### 均質分析例 1

均質分析の1実施例は、適するプローブ（たとえば抗体もしくはDNA）に結合したアップコンバート性燐ラベルを使用する。燐標識されたプローブは、捕獲表面に結合する標的（たとえば抗原もしくは核酸）に対し特異的に結合する。適する捕獲表面は光伝導性光学繊維の先端（第23図）または試料容器の底部表面（第24図）とすることができる。標的標識された捕獲表面を燐標識プローブと共に培養すると、燐粒子は捕獲表面上に存在する標的の量に応じて捕獲表面に蓄積する。標的は捕獲表面に直接に結合することができ、或いはそれ自身で捕獲表面に結合する結合剤（たとえば標的に対し反応性の特異的抗体、標的を結合するポリヌクレオチドなど）との相互作用により固定化することもできる。

捕獲表面に結合した燐の検出は、大断面の低強度ビームから小断面の高強度ビームまで、捕獲表面に存在する或いはそれに極めて近いビームの焦点で集束する励起光を用いて行われる。励起光の集束は、極めて小さい焦点距離を有する光学部材に対する伝送によって行われ、ビームが捕獲表面の短距離内で発散して強度が低くなる。

アップコンバート性燐ラベルから放出される光の強度は2乗もしくはそれ以上まで上昇する励起光強度に比例するので、励起源の焦点近くの燐は、捕獲表面から離れた試料における懸濁状態に保たれる燐よりも顕著に多い光を発光する。し

たがって、アップコンバート性燐結合プローブと捕獲表面との結合は、全体とし

て試料から測定される或いは燐が捕獲表面に結合しない比較試料から測定される発光光強度の増加をもたらす。発光光強度は、所定の標的濃度を有する一連の試料を基準化（検量）につき用いて、標的濃度の関数としてプロットすることができる。試験試料（未知濃度の標的）からの発光光強度を標準曲線と比較して、標的の濃度を測定することができる。

適する均質分析形式の例は限定はしないが免疫診断サンドイッチ分析、並びに抗原および／または抗体表面競合分析を包含する。

#### 均質分析例2

他の実施例は、遠心分離もしくは重力沈降を用いて検出表面におけるアップコンバート性燐結合プローブの蓄積を可能にする。この実施例において、アップコンバート性燐は複数プローブに結合する。全てのプローブは同じ標的に結合せねばならないが、この結合は異なる位置で得ることができる（たとえば抗体プローブは単一抗原における種々異なるエピトープを標的とすることができる）。次いでマルチプローブ燐を用いて、試料における溶液もしくは懸濁物の標的の凝集を行うことができる。この凝集は、溶液もしくは懸濁物から沈殿する大きい不溶性燐-プローブ-標的複合体の形成をもたらす。燐を含有する凝集複合体は検出表面に蓄積する一方、非凝集物質は溶液もしくは懸濁物に残留する。検出は、急激に収束する励起ビームを用いて上記例に記載したように行われる。

以上、明瞭に理解する目的で実施例により本発明を詳細に説明したが、本発明の範囲内において多くの改変をなしうるのが当業者には了解されよう。

【図1】

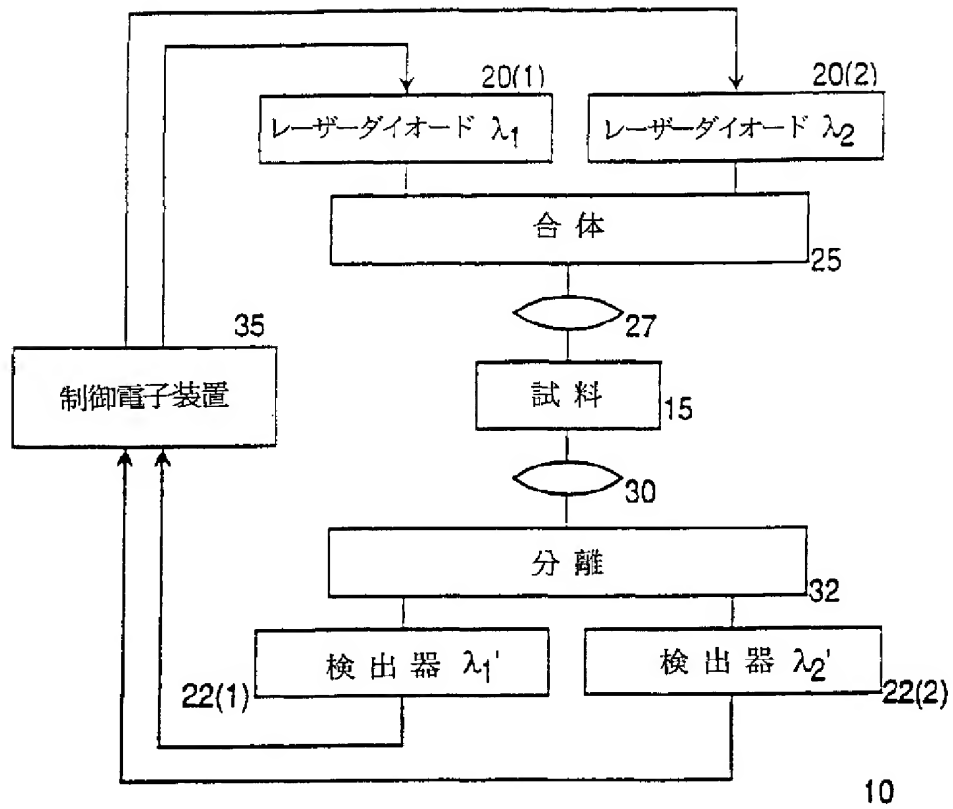


FIG. 1

【図2A】

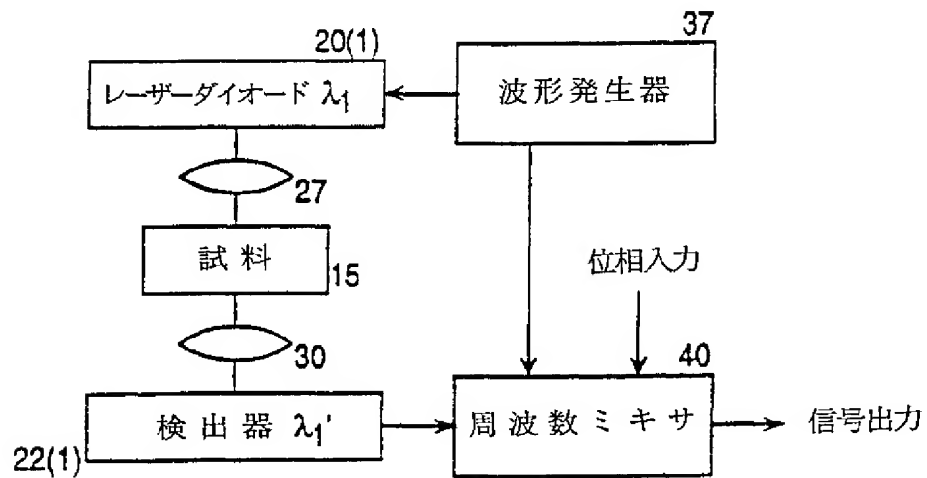


FIG. 2A



【図2B】

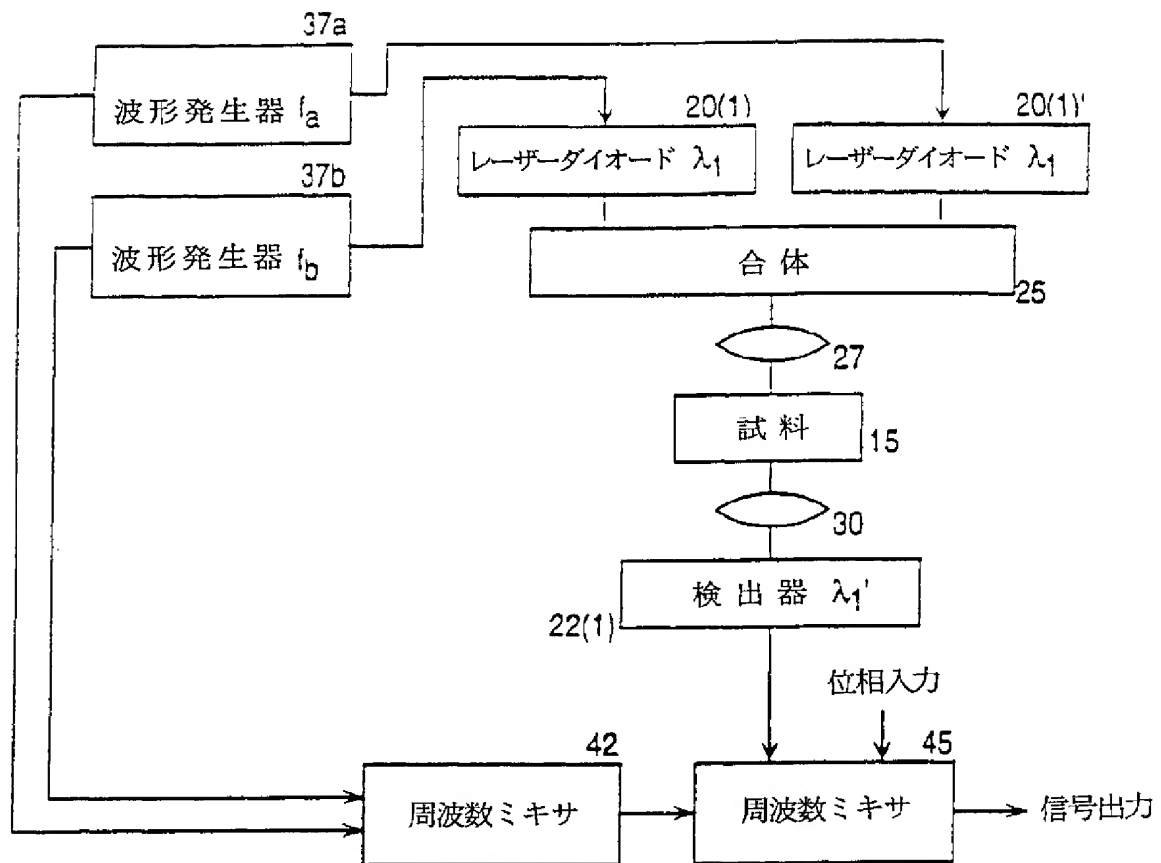


FIG. 2B

【図 3】

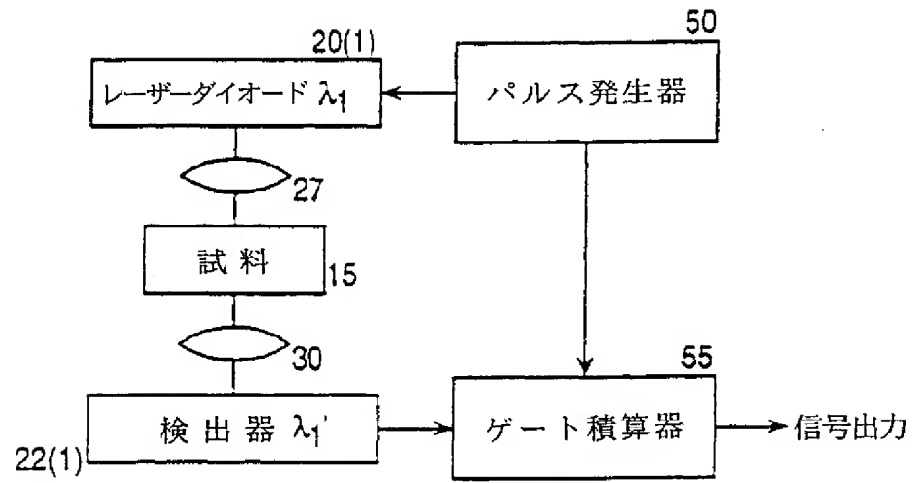


FIG. 3

【図 4】

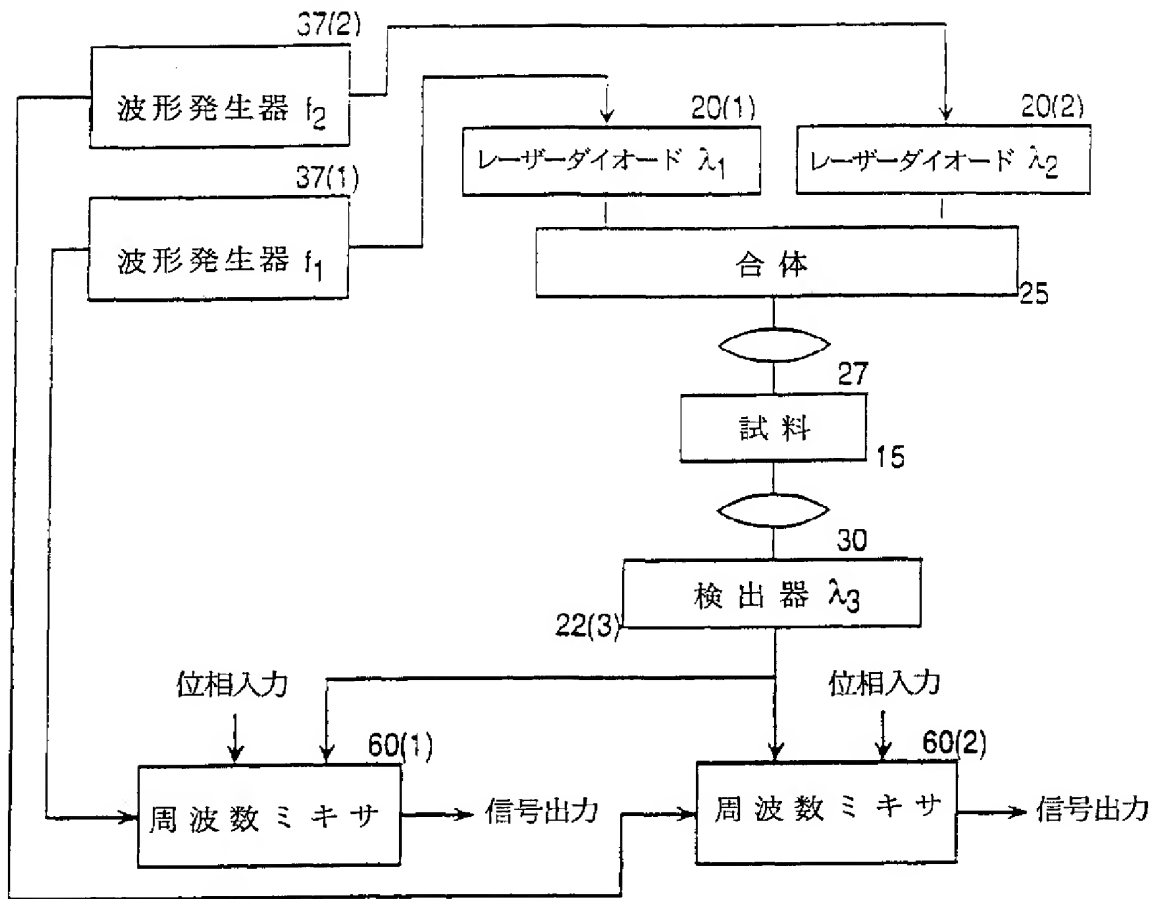


FIG. 4

【図 5 A】

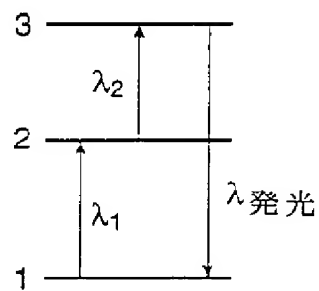


FIG. 5A

【図 5 B】

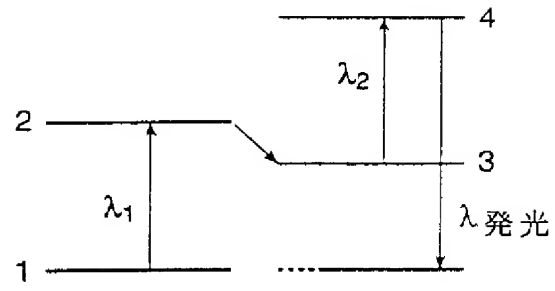


FIG. 5B

【図 5 C】

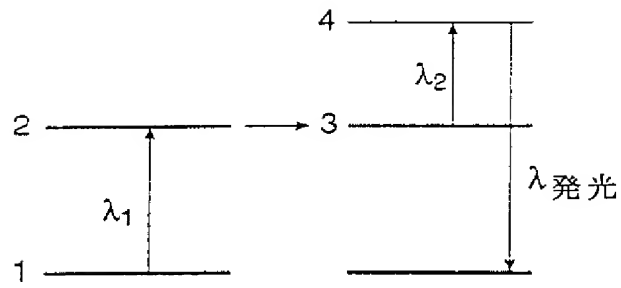


FIG. 5C

【図6】

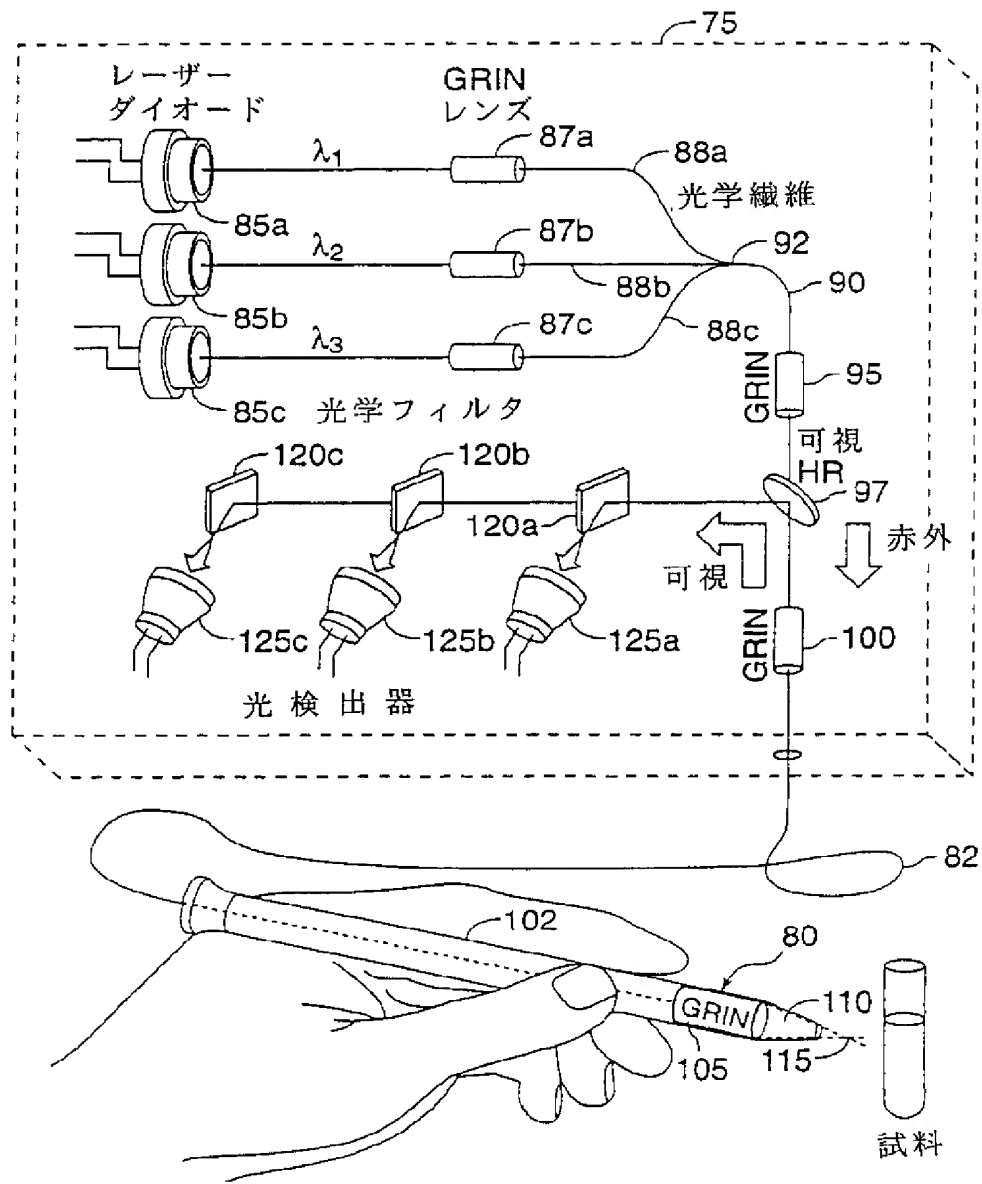


FIG. 6

【図7A】

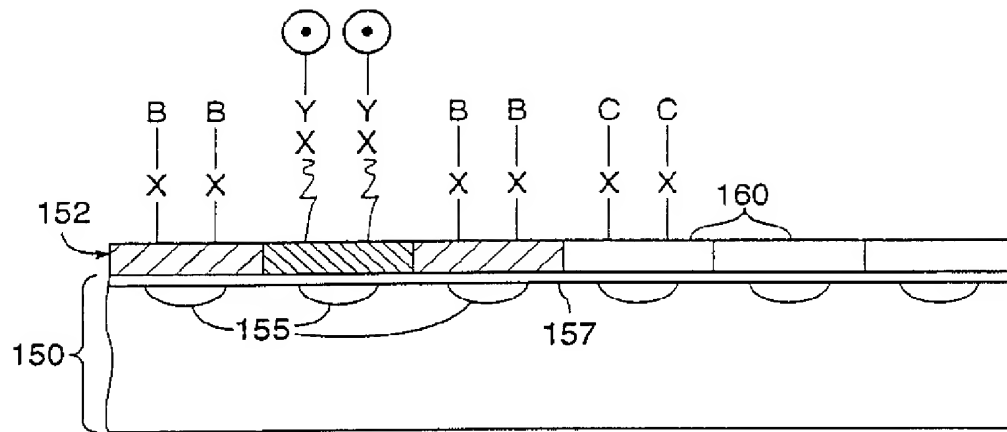


FIG. 7A

【図7B】

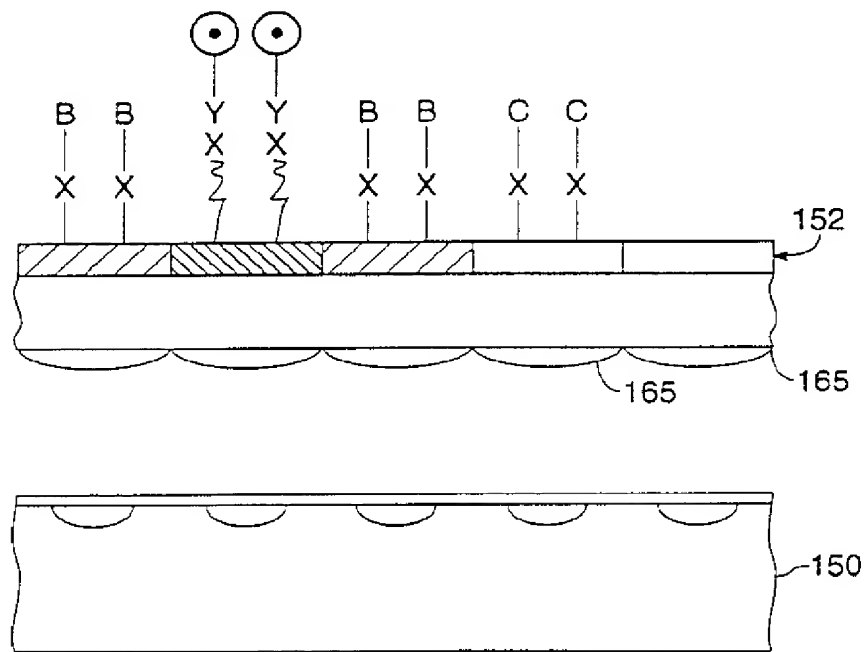


FIG. 7B

【図8】

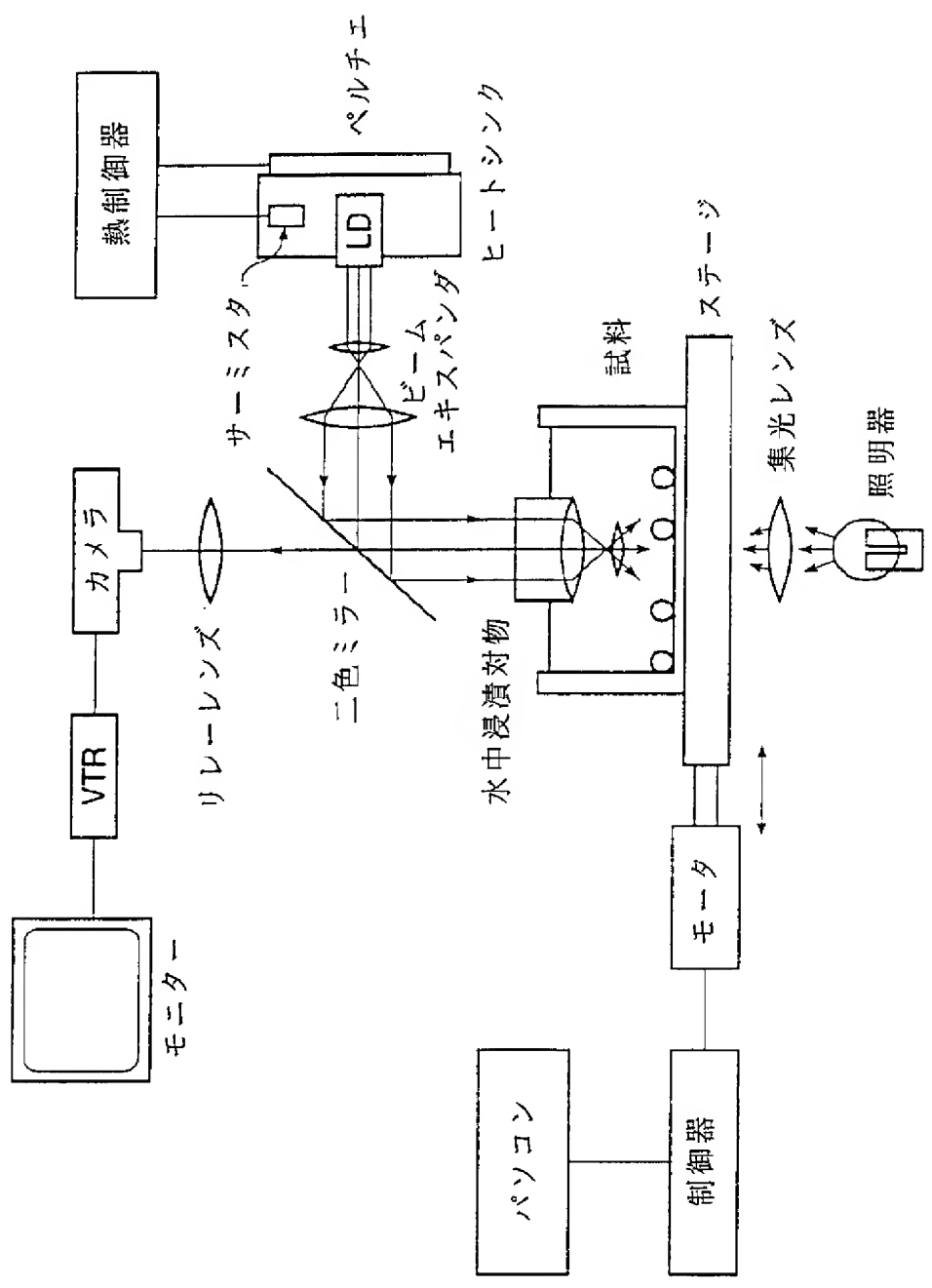


FIG. 8

【図9】

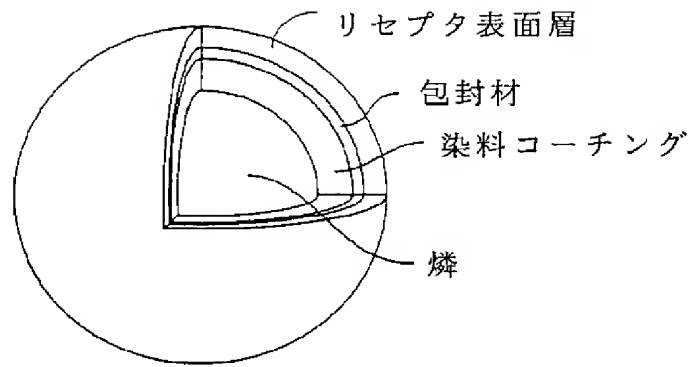


FIG. 9

【図10】

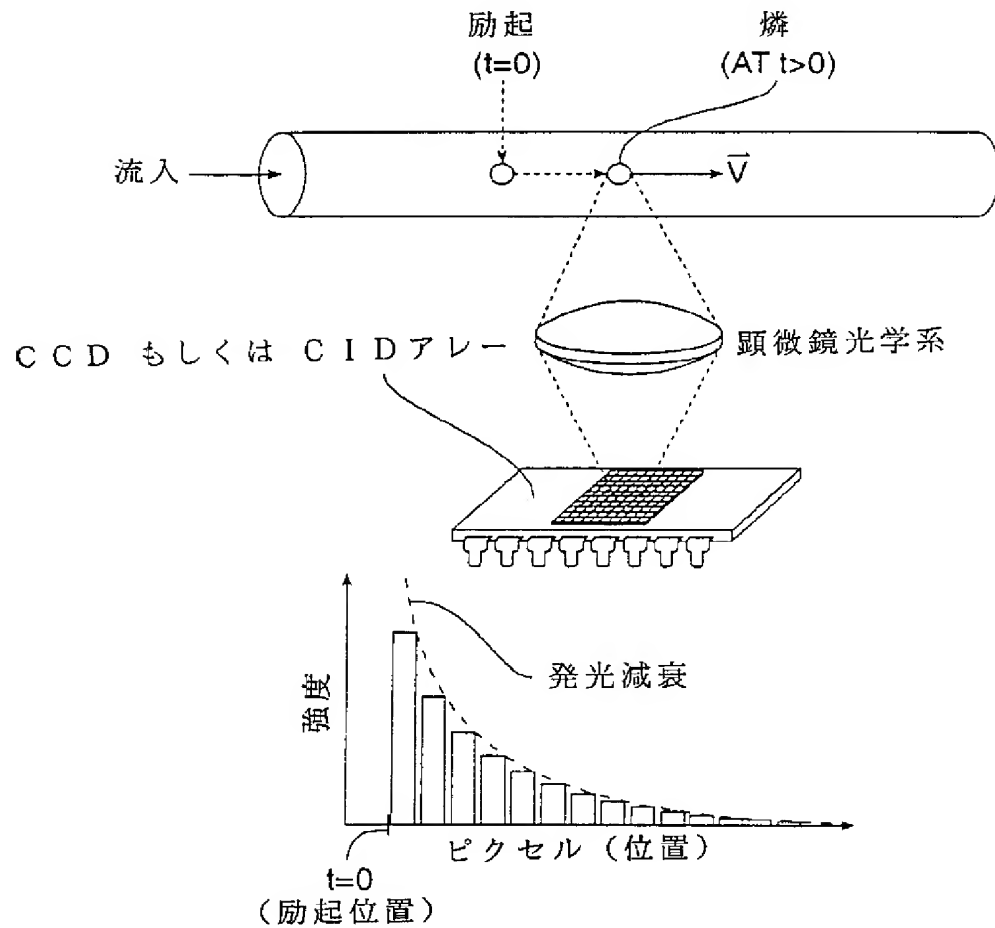


FIG. 10



【図 1 1】

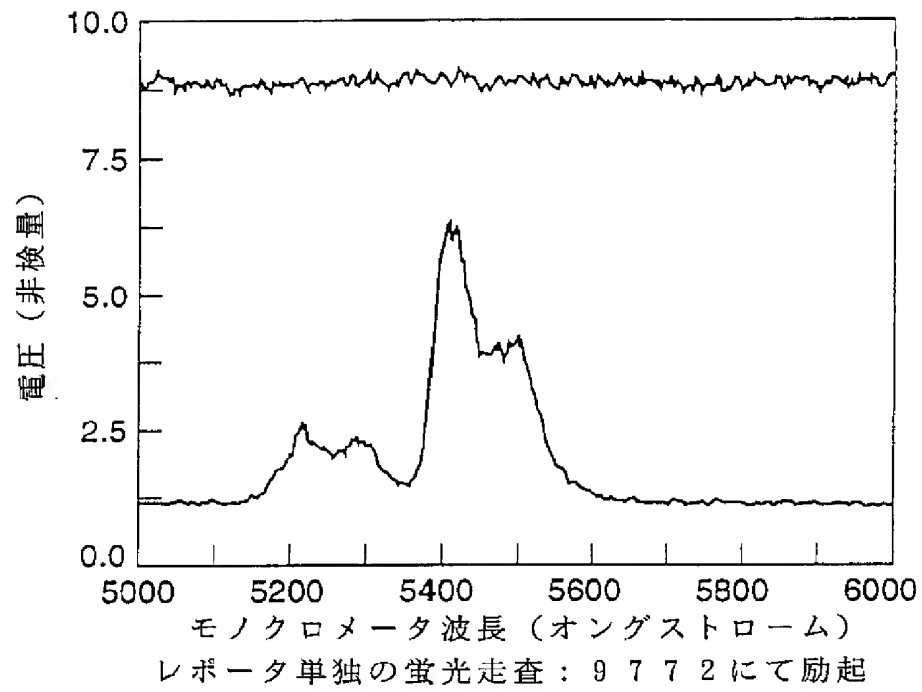
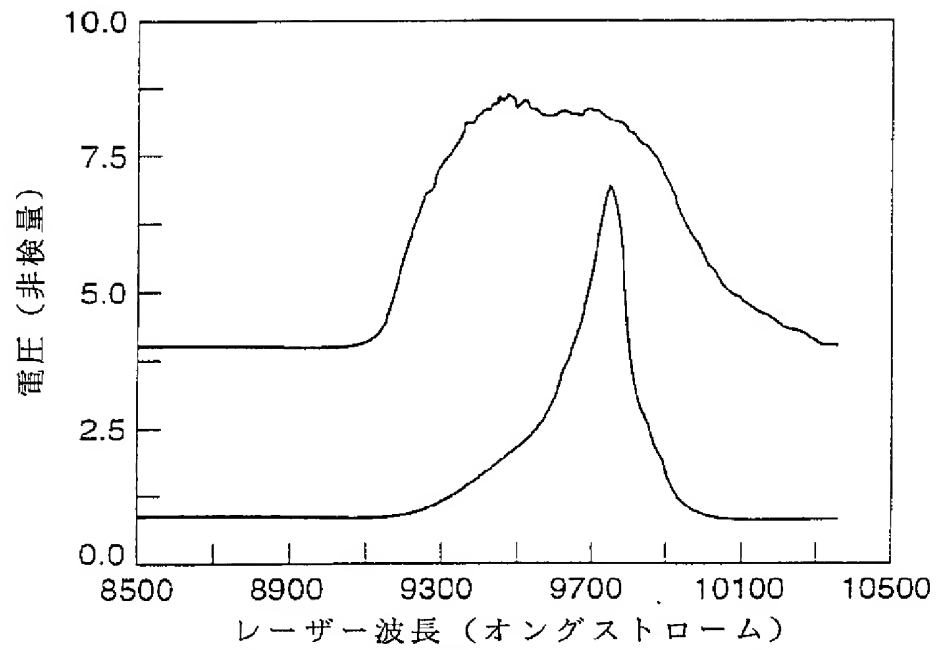


FIG. 11

【図12】



レーザー波長 (オングストローム)  
レポータ単独の励起走査: 5410 Åに集まるLIF

FIG. 12

【図13】

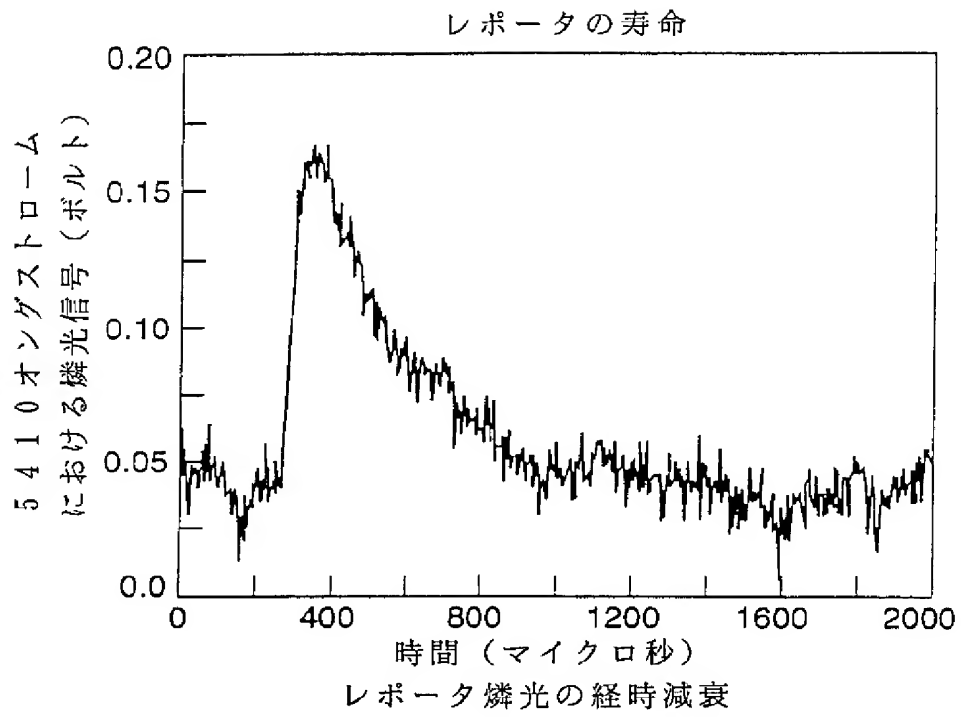


FIG. 13

【図14】

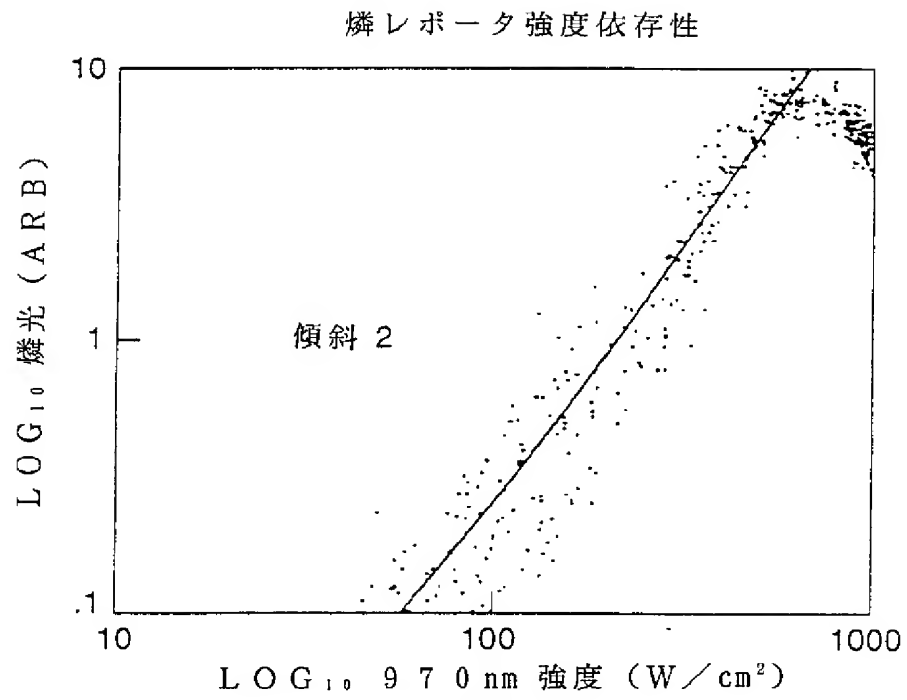
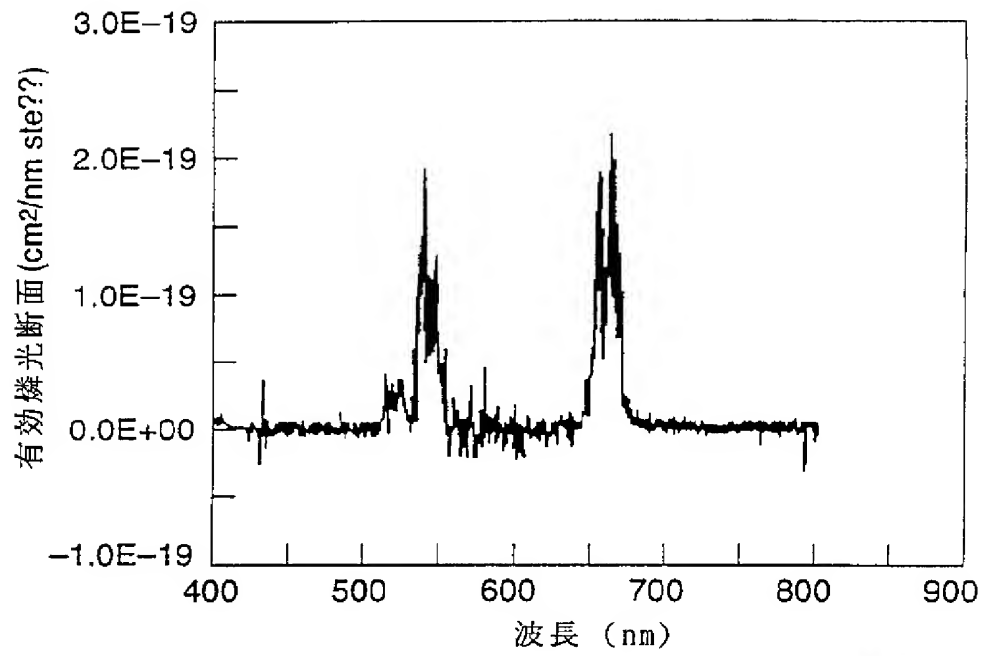


FIG. 14

【図 15】



$\text{Na}(\text{Y}_{0.8}\text{Yb}_{0.18}\text{Er}_{0.02})\text{F}_4$  - 975 nm ポンプの発光

FIG. 15

【図16】

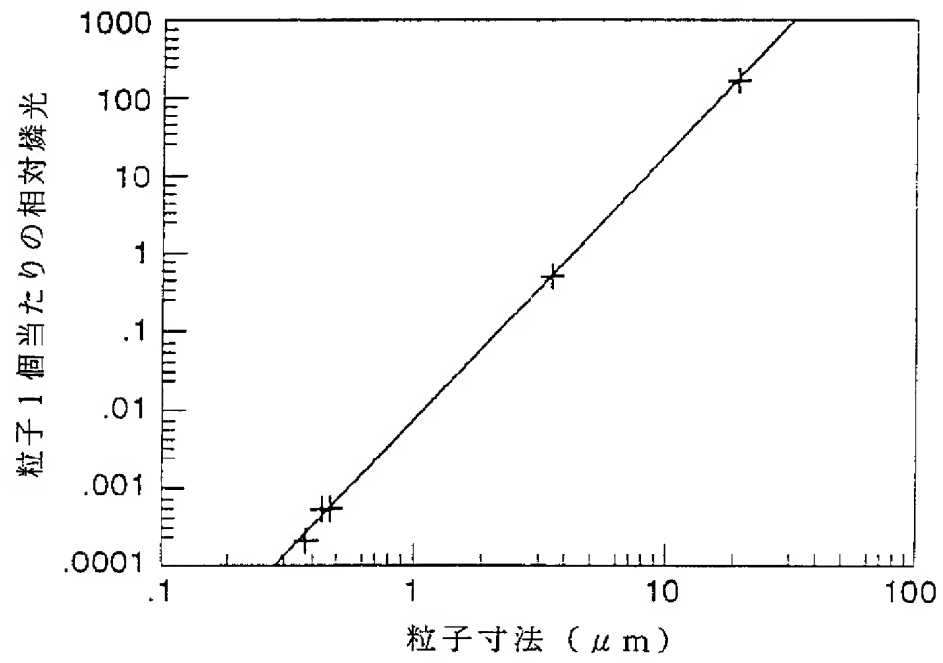


FIG. 16

【図17A】

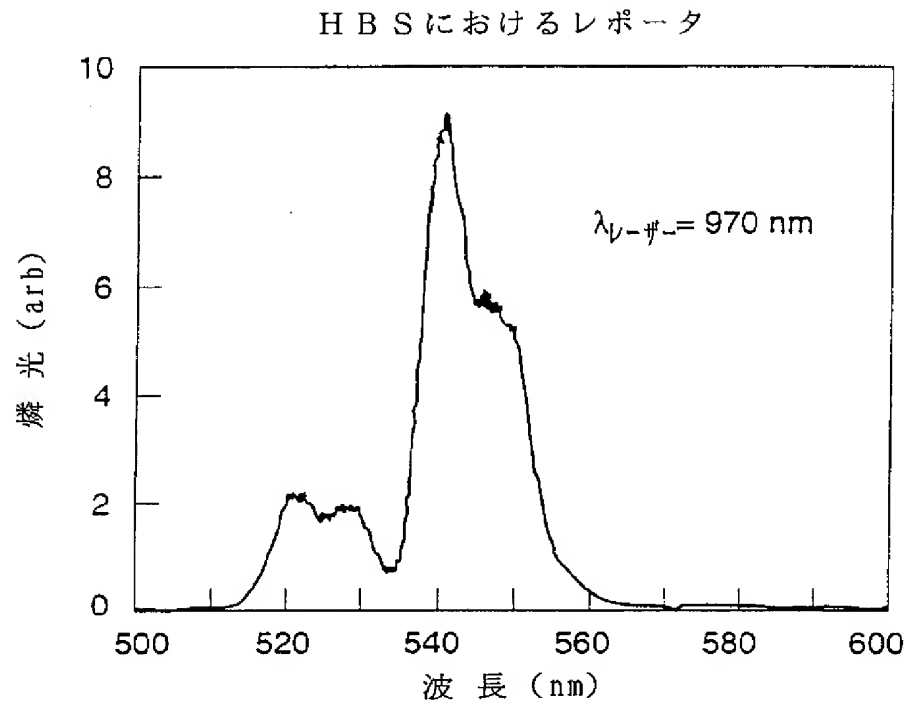
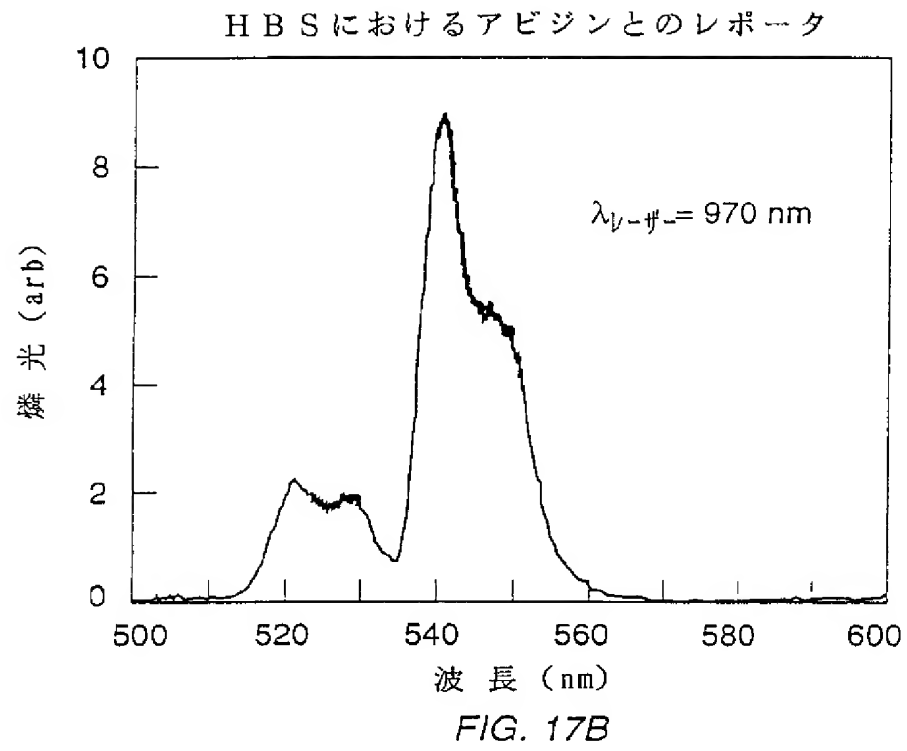


FIG. 17A

【図17B】





【図18A】

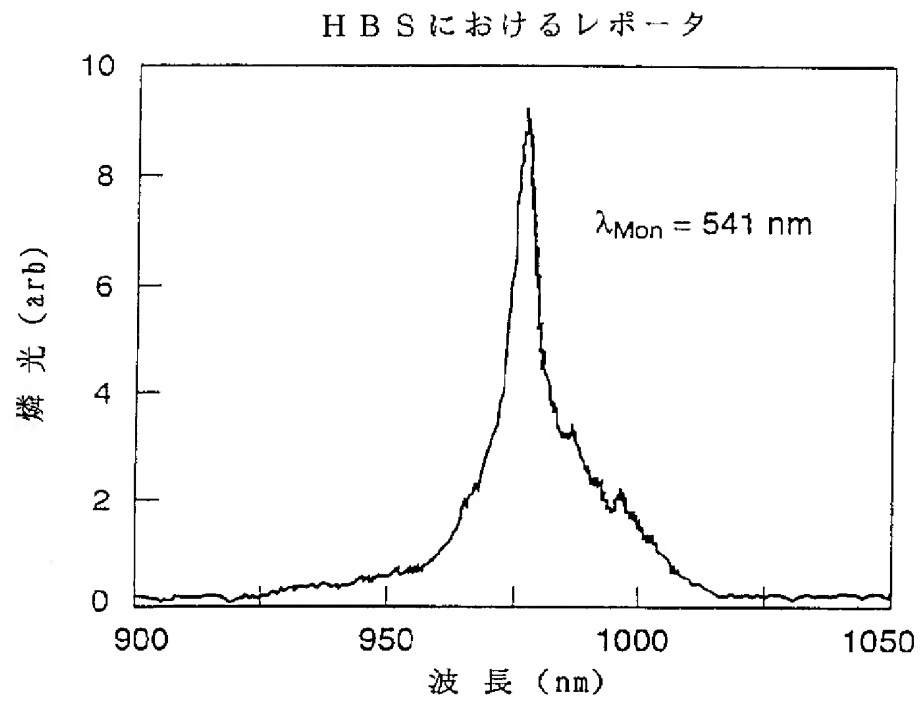
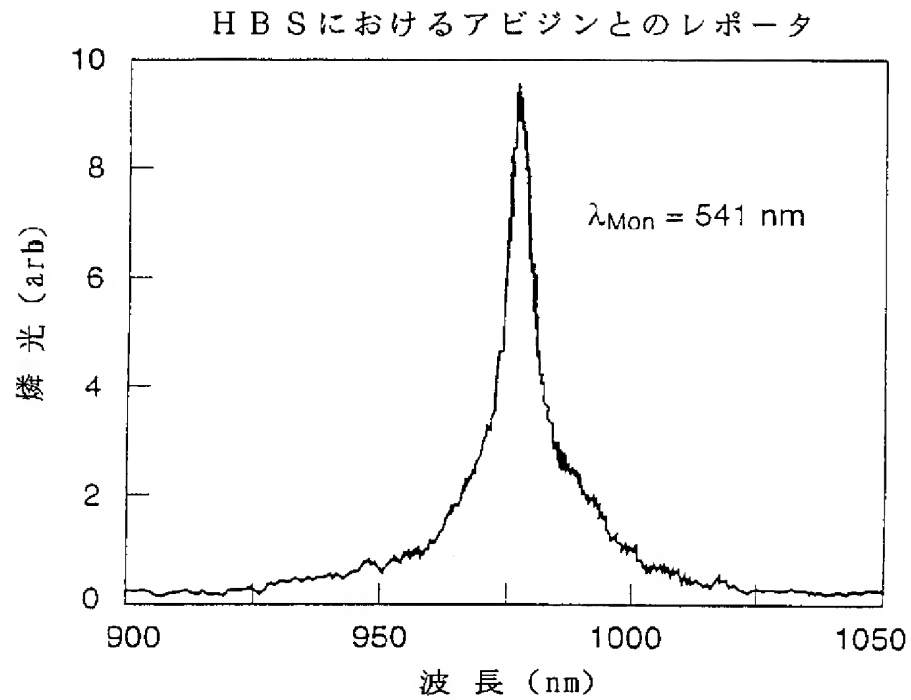
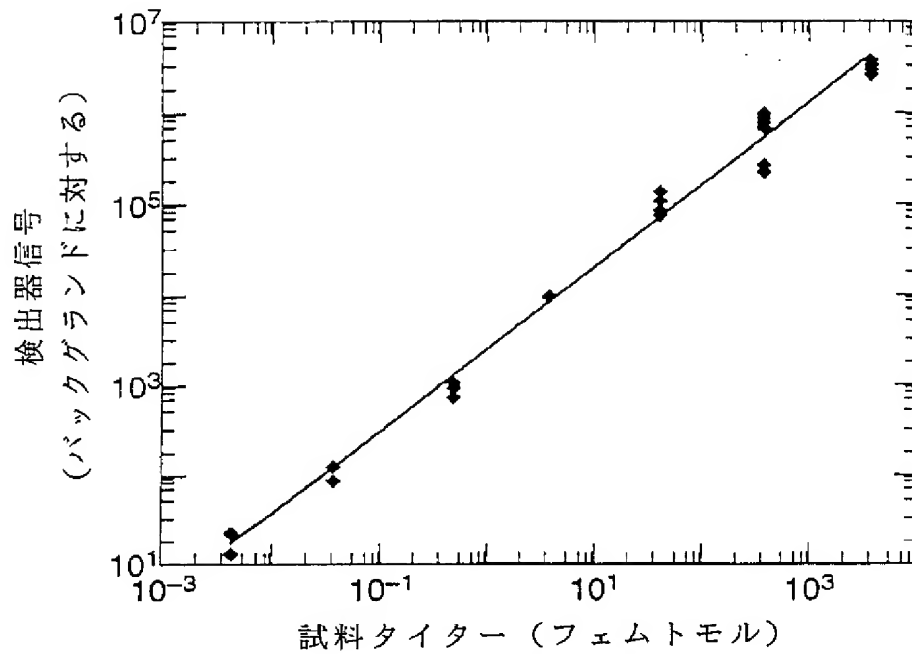


FIG. 18A

【図18B】



【図19】



【図20】

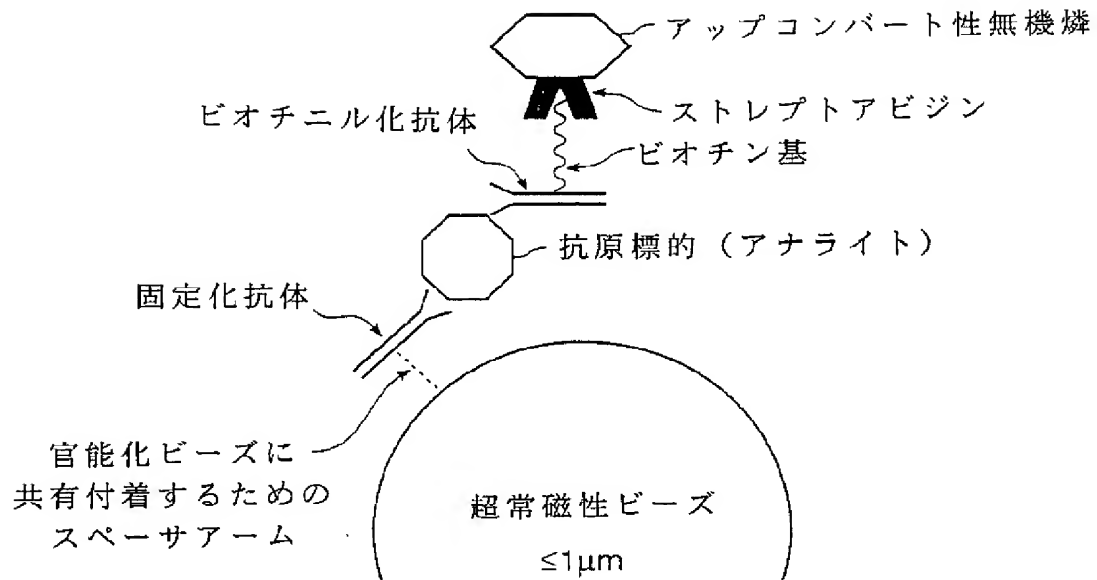


FIG. 20

【図21】

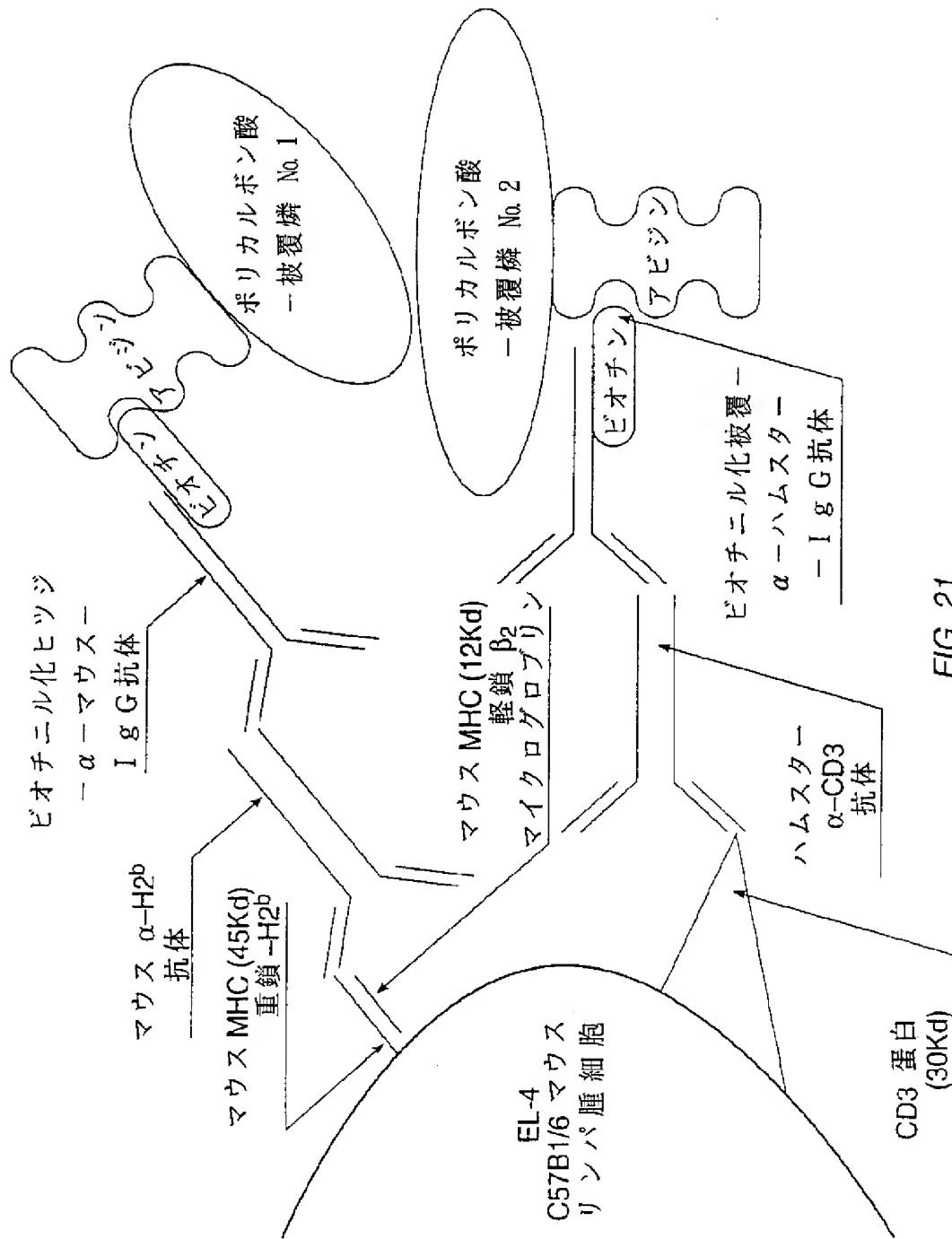


FIG. 21

【図22】

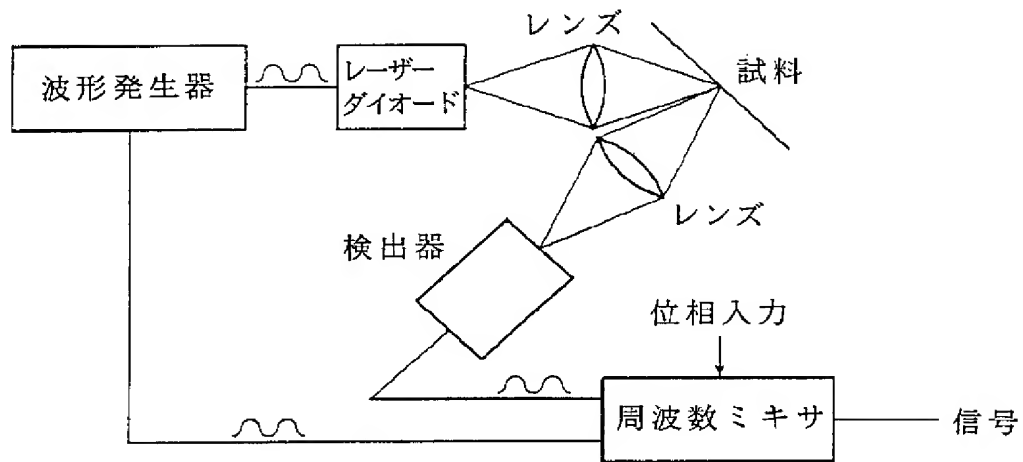


FIG. 22

【図23】

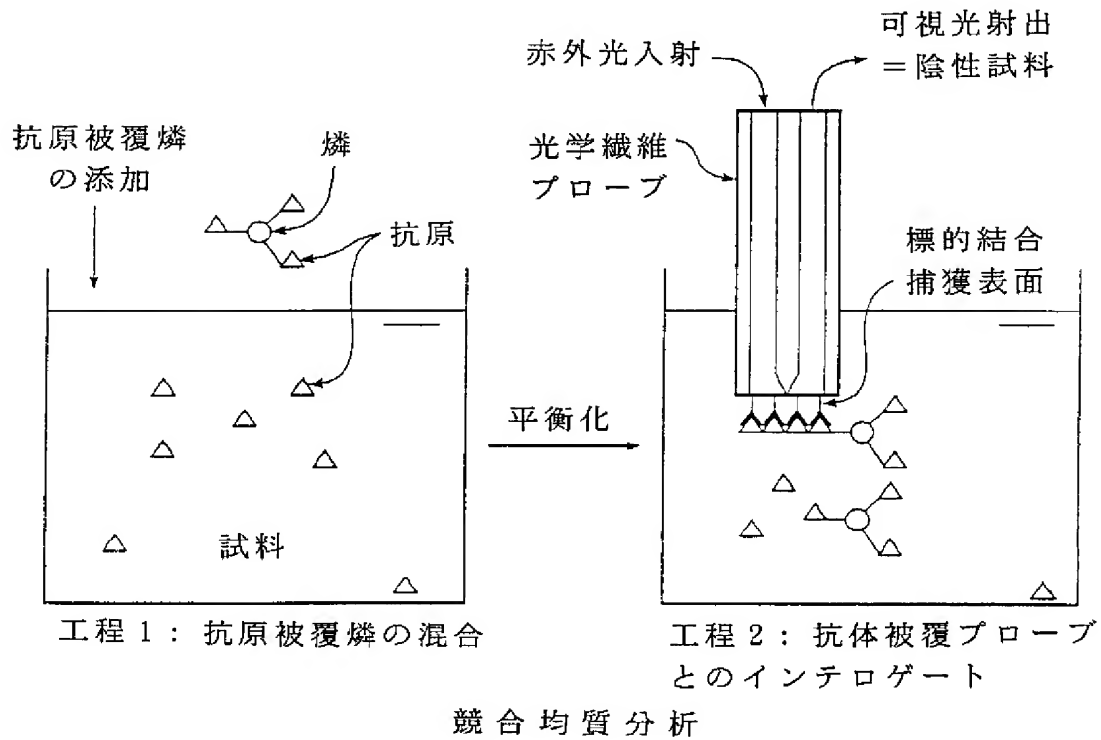


FIG. 23

【図24】

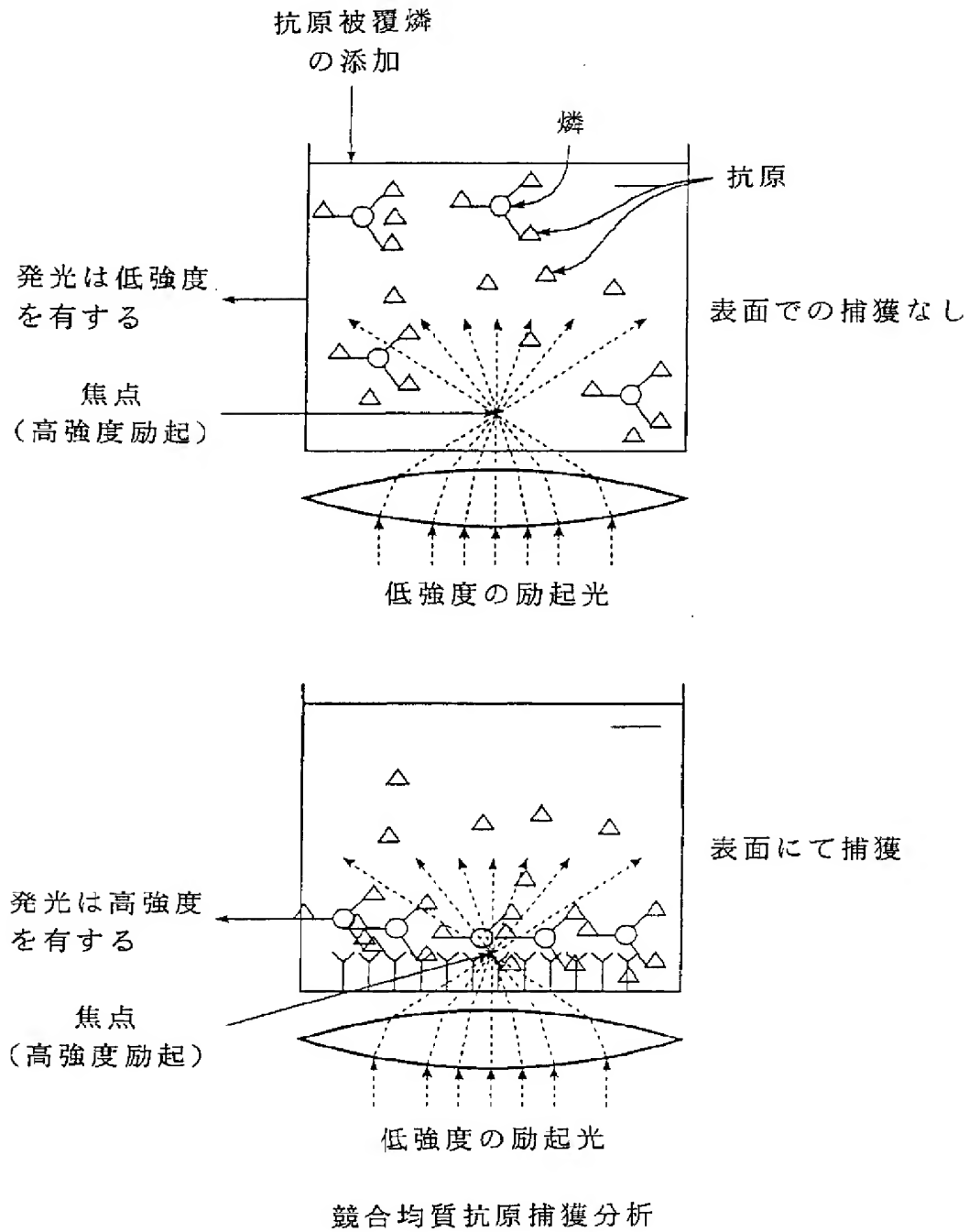
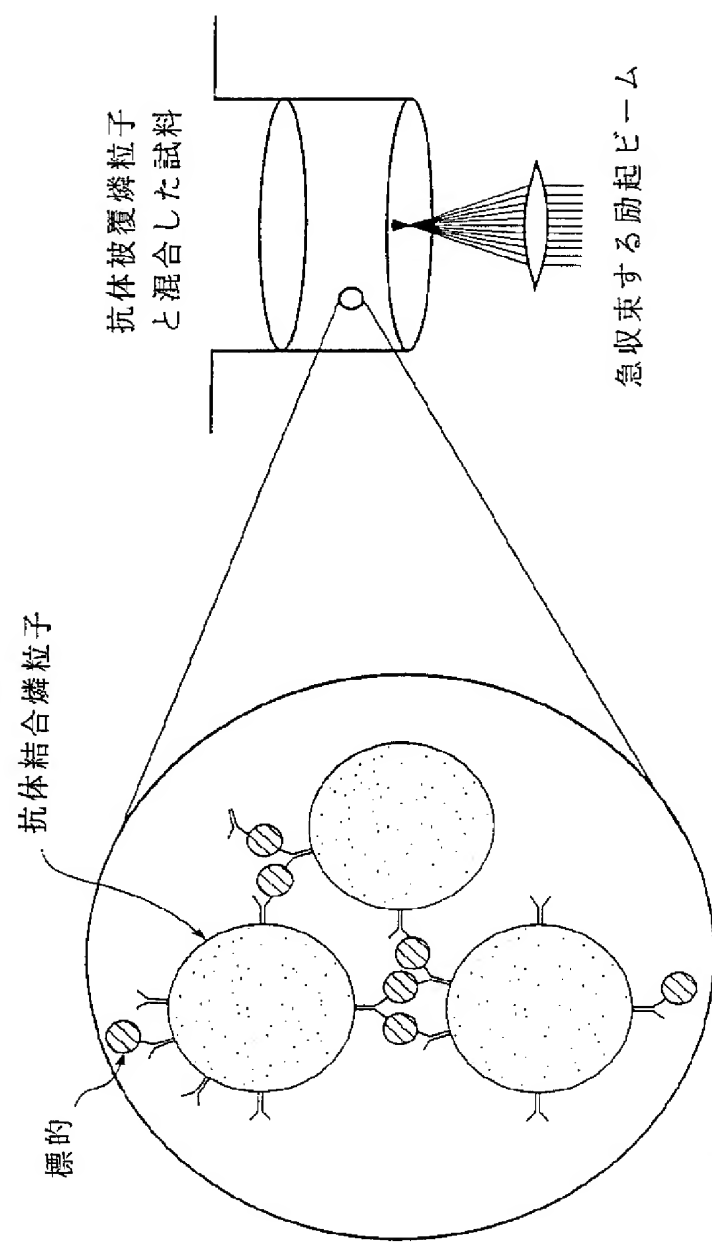


FIG. 24

【図25】



アナライトの存在下に、抗体被覆燐は充分大きい複合体を形成して穴の底部まで落下する。

均質免疫沈殿分析

FIG. 25

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern al Application No  
PCT/US 93/08712

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                                                      |                                                                     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER<br>IPC 5 G01N33/58 G01N21/64                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                      |                                                                     |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                      |                                                                     |
| B. FIELDS SEARCHED<br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>IPC 5 G01N                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                      |                                                                     |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                      |                                                                     |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                      |                                                                     |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                      |                                                                     |
| Category *                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                   | Relevant to claim No.                                               |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | WO,A,87 00926 (RIJKSUNIVERSITEIT LEIDEN)<br>12 February 1987<br>cited in the application<br>& US,A,5 043 265 (J. H. TANKE ET AL.)<br>---                                             |                                                                     |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | US,A,5 132 242 (S. W. CHEUNG ET AL.) 21<br>July 1992<br>cited in the application<br>---                                                                                              |                                                                     |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | SCIENCE<br>vol. 248, no. 4951, 6 April 1990<br>pages 73 - 76 XP000381741<br>W. DENK ET AL. 'TWO-PHOTON LASER SCANNING<br>FLUORESCENCE MICROSCOPY'<br>cited in the application<br>--- |                                                                     |
| -/--                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                                                      |                                                                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                      |                                                                     |
| * Special categories of cited documents :<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principles or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"Z" document member of the same patent family |                                                                                                                                                                                      |                                                                     |
| Date of the actual completion of the international search<br><br>17 December 1993                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |                                                                                                                                                                                      | Date of mailing of the international search report<br><br>14. 01 94 |
| Name and mailing address of the ISA<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 LV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 631 epo nl,<br>Fax (+31-70) 340-3016                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                      | Authorized officer<br><br>Cartagena y Abella, P                     |



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 93/08712

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                              | Relevant to claim No. |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A          | CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 110, no. 4,<br>23 January 1989, Columbus, Ohio, US;<br>abstract no. 30750b,<br>O. YA. MANASHIROV ET AL. 'EFFECT OF THE<br>PURITY OF INITIAL SUBSTANCES ON<br>LUMINESCENCE INTENSITY OF ERBIUM IN<br>ANTI-STOKES LUMINOPHORES.'<br>page 457 ;<br>see abstract<br>& VYSOKOCHIST. VESHCHISTVA<br>vol. 3 , 1988 , RUSS.<br>pages 198 - 201 | 3                     |
| A          | EP,A,0 476 556 (TAKEDA CHEMICAL<br>INDUSTRIES, LTD) 25 March 1992<br>see the whole document                                                                                                                                                                                                                                                                     | 32-45                 |
| A          | US,A,4 100 416 (T. R. HIRSCHFELD ET AL.)<br>11 July 1978<br>see the whole document                                                                                                                                                                                                                                                                              | 32-45                 |
| A          | US,A,4 724 217 (S. M. MILLER) 9 February<br>1988<br>see the whole document                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 32-45                 |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.  
PCT/US 93/08712

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s)                         | Publication<br>date              |
|-------------------------------------------|---------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------|
| WO-A-8700926                              | 12-02-87            | EP-A, B 0232357<br>JP-T- 63500400<br>US-A- 5043265 | 19-08-87<br>12-02-88<br>27-08-91 |
| US-A-5043265                              | 27-08-91            | EP-A, B 0232357<br>JP-T- 63500400<br>WO-A- 8700926 | 19-08-87<br>12-02-88<br>12-02-87 |
| US-A-5132242                              | 21-07-92            | US-A- 5194300                                      | 16-03-93                         |
| EP-A-0476556                              | 25-03-92            | JP-A- 5034290                                      | 09-02-93                         |
| US-A-4100416                              | 11-07-78            | NONE                                               |                                  |
| US-A-4724217                              | 09-02-88            | NONE                                               |                                  |

---

フロントページの続き

- |                          |      |          |     |
|--------------------------|------|----------|-----|
| (51)Int.Cl. <sup>6</sup> | 識別記号 | 庁内整理番号   | F I |
| G 0 1 N 33/74            |      | 8310-2 J |     |
- (72)発明者 ペツパーズ, ノーマン・エー  
アメリカ合衆国カリフォルニア州94002  
ベルモント、ヒルクレスト・ドライブ  
3619
- (72)発明者 ケーン, ジェームズ  
アメリカ合衆国ニュージャージー州08648  
ローレン スヴイル、ロイヤル・オー  
ク・ロード 32
- (72)発明者 ファリス, グレゴリー・ダブリュー  
アメリカ合衆国カリフォルニア州94025  
メンロ・パーク、フーヴァー・ストリート  
1259
- (72)発明者 ダイヤー, マーク・ジェー  
アメリカ合衆国カリフォルニア州95123  
サン・ホゼ、ブラックフット・コート  
705